



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ  
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Ν. ΚΑΡΑΓΙΩΡΓΟΥ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΛΑΡΙΣΑ 2024**

**Μελέτη νέων αυτοαντισωμάτων ως βιοδείκτες αυτοάνοσων  
νευρολογικών νοσημάτων**

## Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

### **Δημήτριος Λεωνίδας (Επιβλέπων Καθηγητής)**

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Σωκράτης Τζάρτος**

Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

### **Μαρία Κοντού**

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

### **Δημήτριος Λεωνίδας (Επιβλέπων Καθηγητής)**

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Σωκράτης Τζάρτος**

Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

### **Μαρία Κοντού**

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Άννα-Μαρία Ψαρρά**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Ιωάννης Τζάρτος**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

### **Σταματία Παπουτσοπούλου**

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Χαράλαμπος Αλεξόπουλος**

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο διαγνωστικό και ερευνητικό εργαστήριο του καθηγητή κ.Σωκράτη Τζάρτου, Τζάρτος Νευροδιαγνωστική, Αθήνα

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Ν. ΚΑΡΑΓΙΩΡΓΟΥ

**Μελέτη νέων αυτοαντισωμάτων ως βιοδείκτες αυτοάνοσων  
νευρολογικών νοσημάτων**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων:10  
Αριθμός συνολικών σελίδων: 140  
Αριθμός πινάκων: 8  
Αριθμός εικόνων: 15  
Αριθμός παραρτημάτων:2  
Αριθμός συμπληρωματικών εικόνων:0  
Αριθμός συμπληρωματικών πινάκων:0  
Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 189

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έχει παρουσιασθεί στις ακόλουθες δημοσιεύσεις:

Tzartos JS, **Karagiorgou K**, Tzanetakos D, et al. Deciphering anti-MOG IgG antibodies: Clinical and radiological spectrum, and comparison of antibody detection assays. *J Neurol Sci*. Mar 15 2020;410:116673.  
doi:10.1016/j.jns.2020.116673

**Karagiorgou K**, Dandoulaki M, Mantegazza R, et al. Novel Cell-Based Assay for Alpha-3 Nicotinic Receptor Antibodies Detects Antibodies Exclusively in Autoimmune Autonomic Ganglionopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. May 2022;9(3)doi:10.1212/NXI.0000000000001162

Pechlivanidou M, Ninou E, **Karagiorgou K**, et al. Autoimmunity to neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Res*. Jun 2023;192:106790.  
doi:10.1016/j.phrs.2023.106790

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αυτοάνοσα νευρολογικά νοσήματα είναι σπάνια νοσήματα με μεγάλη ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο των ασθενών. Η χρήση ειδικών βιοδεικτών είναι σημαντικό εργαλείο στην διάγνωση των ασθενειών αυτών. Από τις πιο καλά μελετημένες αυτοάνοσες διαταραχές είναι αυτές που επάγονται από αυτοαντισώματα. Τα αυτοαντισώματα έχουν παθογόνο ρόλο κυρίως όταν στοχεύουν σε αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (nAChR) και η MOG γλυκοπρωτεΐνη. Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ανάπτυξη και χρήση βελτιωμένων τεχνικών ανίχνευσης δυνητικά παθογόνων αντισωμάτων έναντι του  $\alpha 3$  και  $\alpha 4$  νευρωνικού nAChR και της MOG γλυκοπρωτεΐνης, ειδικών για αυτοάνοσες νευρολογικές νόσους όπως η αυτοάνοση αυτόνομη γαγγλιονοπάθεια (AAG), η αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (AES) και η νόσος με αντισώματα έναντι της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOGAD). Οι νευρωνικοί nAChRs διακρίνονται σε πολλούς υπότυπους και εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες όπως η μνήμη, η μάθηση, ο έλεγχος της κίνησης και η αναλγησία. Η απώλεια ή δυσλειτουργία τους σχετίζεται με πολλές νευρολογικές και νευροψυχιατρικές ασθένειες. Τα αντισώματα έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs, μπορεί να έχουν παθογόνες ιδιότητες με αποτέλεσμα την αλλοίωση της συναπτικής μετάδοσης στο συμπαθητικό, το παρασυμπαθητικό και τα εντερικά γάγγλια. Τέτοια αντισώματα έχουν βρεθεί σε ασθενείς με AAG, ωστόσο χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs, ανιχνεύονται τόσο στην AAG όσο και σε διάφορα νευρολογικά νοσήματα με άγνωστες κλινικές και θεραπευτικές επιπτώσεις. Η χρήση της δοκιμασίας ραδιοανοσοκαθίζησης (RIPA), είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανοσολογική διάγνωση της AAG, ωστόσο η ειδικότητά της είναι περιορισμένη καθώς το 50% περίπου των ασθενών με χαμηλά επίπεδα  $\alpha 3$ -nAChR αντισωμάτων παρουσιάζουν μια ποικιλία διαταραχών εκτός της AAG. Για τον λόγο αυτό αναπτύξαμε δοκιμασία κυτταρικού ανοσοφθορισμού (CBA) με την οποία ανιχνεύονται ειδικά μόνο τα δυνητικά παθογόνα αντισώματα για την AAG. Η χρήση μοριακών συνοδών NACHO και RIC3, η αφαίρεση αλληλουχιών-ετικέτα από τους υποδοχείς (myc flag και GFP) καθώς και η προσθήκη νικοτίνης, βοήθησαν στην αύξηση της έκφρασης του  $\alpha 3$ -nAChR με αποτέλεσμα το CBA που αναπτύξαμε να ανιχνεύει τα αντισώματα έναντι των εκτεθειμένων στην

επιφάνεια των κυττάρων επίτοπων με μεγάλη ευαισθησία. Μελετήσαμε ορούς 55 ασθενών από την Ελλάδα, «ύποπτους» για βλάβη στο αυτόνομο σύστημα και 13 ασθενείς από την Ιταλία, διαγνωσμένοι με αυτόνομη ανεπάρκεια και θετικοί για αντι-α3 nAChR αντισώματα με την RIPA. Επίσης ελέγχθηκαν οροί από 52 ασθενείς με αντι-VGCC ή αντι-Hu αντισώματα και 2628 ως μάρτυρες με διάφορες νευροάνοσες ασθένειες. Από τους 25 θετικούς ασθενείς για αντι-α3 nAChR αντισώματα με την RIPA, οι 15 βρέθηκαν θετικοί με το CBA που αναπτύξαμε και επιβεβαιώνονται και κλινικά ότι ανήκουν στην AAG, ενώ οι υπόλοιποι είχαν άλλες νευρολογικές ασθένειες. Επιπλέον, αντισώματα έναντι του α4β2-nAChR, είναι υποψήφια αυτοαντιγόνα στο σύνδρομο αυτοάνοσης εγκεφαλοπάθειας (AES), ένα φάσμα νευρολογικών ασθενειών που χαρακτηρίζεται από ταχεία έναρξη με ψυχικές διαταραχές, διαταραχές μνήμης και επιληπτικές κρίσεις. Βασιζόμενοι στο α3β2-nAChR CBA, βελτιώσαμε την μέθοδο ανίχνευσης των δυνητικά παθογόνων αντισωμάτων του α4β2-nAChR, για την ταυτοποίηση αυτοαντισωμάτων σε «ορφανές» περιπτώσεις AES. Ελέγξαμε 1752 ορούς ασθενών από την Ελλάδα, την Τουρκία και την Ιταλία που ζήτησαν έλεγχο για AES και 1203 ορούς ασθενών «ελέγχου» με άλλες νευροψυχιατρικές ασθένειες. 3 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για αντισώματα έναντι του α4β2-nAChR. Τα ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά των 3 θετικών ασθενών συμπίπτει με το φάσμα της AES.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης αυτής, ασχοληθήκαμε με την μελέτη ανίχνευσης των αντισωμάτων κατά της MOG σε ασθενείς με απομυελινωτικά νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος, με στόχο την βελτίωση της τεχνικής ανίχνευσης τους και την εντόπιση τους μόνο σε ασθενείς που ανήκουν στην MOGAD. Η MOGAD είναι μια φλεγμονώδη απομυελινωτική νόσος στην οποία ο έλεγχος των αντι-MOG αντισωμάτων είναι ένα σημαντικό εργαλείο στην εργαστηριακή διάγνωση της. Ωστόσο, επειδή αντι-MOG αντισώματα ανιχνεύονται και σε άλλες απομυελινωτικές νόσους, είναι σημαντική η ύπαρξη ενός πολύ ειδικού και ευαίσθητου CBA για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων. Διερευνώντας το κλινικό και ακτινολογικό φάσμα 21 ασθενών θετικών για IgG1 αντι-MOG, που εντοπίστηκαν σε μία ελληνική ομάδα 426 ασθενών, «ύποπτοι» για MOGAD, και συγκρίνοντας τα τρία πιο κοινά χρησιμοποιούμενα CBA για την ανίχνευση των αντι-MOG (live IgG-CBA, live

IgG1-CBA και εμπορικό CBA), καταλήξαμε ότι το live IgG1-CBA υπερισχύει σε ειδικότητα έναντι των άλλων. Οι 21 MOG-θετικοί ασθενείς με το live IgG1-CBA χαρακτηρίστηκαν σε βάθος και είχαν τα κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με MOGAD.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό και διαγνωστικό εργαστήριο νευροανοσολογίας των καθηγητών κυρίου Σωκράτη Τζάρτου και κυρίου Ιωάννη Τζάρτου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και βαθιές ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Σωκράτη Τζάρτο για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του. Η καθοδήγηση, η συμπαράσταση και η ανεξάντλητη ερευνητική του διάθεση, ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή κύριο Δημήτρη Λεωνίδα για την τιμή που μου έκανε να είναι επιβλέπων στην διατριβή αυτή. Ήταν μεγάλη μου χαρά να είναι επιβλέπων καθηγητής μου στο προπτυχιακό στάδιο των σπουδών μου και τώρα να είναι επιβλέπων και στην διδακτορική μου διατριβή. Η επιστημονικότητα και η πάντα καλή διάθεση του με βοήθησαν ουσιαστικά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ιωάννη Τζάρτο για την καθοριστική και ουσιαστική συμβολή του καθ'όλη την διάρκεια της διατριβής αυτής καθώς και την επίκουρο καθηγήτρια κυρία Μαρία Κοντού που μου έδωσε μεγάλη να χαρά να είναι στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους και συνεργάτες του εργαστηρίου Τζάρτος Νευροδιαγνωστική για την άψογη συνεργασία που έχουμε όλα αυτά τα χρόνια.

Άπειρα ευχαριστώ οφείλω στον σύζυγο μου Σπύρο για την στήριξη του καθώς και στην μικρή μας κόρη Αλεξάνδρα που δίνει νόημα και ουσία στην ζωή μας.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, Νίκο και Πόλυ που μου έμαθαν να παλεύω, να συνεχίζω και να κοιτάω μπροστά.

***Στον μπαμπά μου, που έφυγε νωρίς...***

***«Αν βλέπω μακριά, είναι γιατί στέκομαι πάνω στους ώμους γιγάντων»  
Νεύτων***



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	4
1.1 ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΩΝΙΚΟΙ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ .....	5
1.1.1 Χολινεργικοί υποδοχείς .....	5
1.1.2 Νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs).....	7
1.1.3 Μυϊκός και μυϊκού τύπου nAChR.....	7
1.1.4 Οι νευρωνικοί νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης.....	9
1.1.5 Λειτουργία νευρωνικών nAChRs .....	11
1.1.6 Πρόσδεση υποκαταστατών στον nAChR .....	14
1.1.6.1 Αγωνιστές του nAChR .....	14
1.1.6.2 Ανταγωνιστές του nAChR .....	16
1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ nAChRs ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ .....	17
1.2.1 Ασθένειες οφειλόμενες στον μυϊκού τύπου nAChR .....	17
1.2.1.1 Βαριά μυασθένεια (Myasthenia Gravis).....	17
1.2.1.2 Συγγενή μυασθενικά σύνδρομα.....	19
1.2.2 Ασθένειες οφειλόμενες σε νευρωνικού τύπου nAChR .....	20
1.2.2.1 Νόσος του Alzheimer .....	21
1.2.2.2 Νόσος του Parkinson.....	22
1.2.2.3 Σχιζοφρένεια.....	23
1.2.3 Αυτοάνοση απόκριση στους νευρωνικούς nAChRs .....	24
1.2.4 Αντισώματα έναντι των α3 nAChRs στην Αυτοάνοση Αυτόνομη Γαγγλιονοπάθεια (Autoimmune Autonomic Ganglionopathy/ AAG).....	25
1.2.5 Αντισώματα έναντι των α3 nAChRs στην Αυτοάνοση Εγκεφαλίτιδα (Autoimmune Encephalitis/ AE) .....	27
1.2.6 Αυτοανοσία στους α7-nAChRs.....	28
1.2.7 Αντισώματα έναντι των α7 nAChRs στην Εγκεφαλίτιδα Rasmussen (Rasmussen Encephalitis/ RE).....	29
1.2.8 Αντισώματα έναντι των α7 nAChRs στην σχιζοφρένεια.....	29
1.2.9 <i>In vivo</i> μελέτες σε ζώα για τους α7 nAChRs.....	31
1.2.10 Αντισώματα έναντι των α7- και α3-nAChRs στην Μυασθένεια Gravis (MG).....	32
1.2.11 Αυτοανοσία στους α4β2-nAChRs .....	33
1.2.12 Αυτοανοσία στους nAChRs σε μη διεγέρσιμους ιστούς .....	34
1.3 ΦΑΣΜΑ ΟΠΤΙΚΗΣ ΝΕΥΡΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ ΚΑΙ MOGAD .....	34

1.3.1	Φάσμα Οπτικής Νευρομυελίτιδας (NMOSD) .....	34
1.3.2	Φάσμα Οπτικής Νευρομυελίτιδας (NMOSD) – Νόσος με αντισώματα έναντι της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOGAD) .....	37
1.3.3	Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου των MOG αντισωμάτων (MOGAD) .....	39
1.3.4	Ανίχνευση των MOG αντισωμάτων στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) .....	40
2	ΣΚΟΠΟΣ .....	41
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	45
3.1	ΥΛΙΚΑ .....	46
3.1.1	Εργαστηριακός εξοπλισμός .....	46
3.1.2	Αναλώσιμα .....	47
3.1.3	Αντιδραστήρια .....	47
3.1.4	Προσσκευασμένα αντιδραστήρια .....	48
3.1.5	Αντισώματα .....	48
3.1.6	Κυτταρικές Σειρές .....	49
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ .....	50
3.2.1	Μέθοδοι κυτταρικής Βιολογίας .....	51
3.2.1.1	Κυτταροκαλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων-Υγρές καλλιέργειες .....	51
3.2.1.2	Παρασκευή αποθέματος βακτηριακών κυττάρων .....	51
3.2.1.3	Στερεές καλλιέργειες .....	51
3.2.1.4	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς 52	
3.2.1.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια .....	52
3.2.1.6	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA .....	52
3.2.2	Καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών .....	53
3.2.2.1	Κυτταρική σειρά HEK293 .....	53
3.2.2.2	Συνθήκες καλλιέργειας HEK293 .....	53
3.2.2.3	Κρυο-διατήρηση και απόψυξη κυττάρων από βαθιά κατάψυξη/υγρό άζωτο .....	54
3.2.2.4	Προετοιμασία κυττάρων για διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τις πρωτεΐνες-στόχους με την μέθοδο της πολυαιθυλενιμίνης .....	54
3.2.2.5	Ανάπτυξη νέας δοκιμασίας που βασίζεται στην αρχή της μεθόδου του κυτταρικού ανοσοφθορισμού .....	58
3.2.2.6	Διαδικασία Ραδιοανοσοκαθίζησης (RIPA) .....	60

3.2.2.7	Συλλογή δειγμάτων και επιδημιολογικών δεδομένων των ασθενών με MOGAD .....	62
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	64
4.1	Ταυτοποίηση ορών θετικών για αντισώματα έναντι των α3-nAChRs με την μέθοδο RIPA .....	65
4.2	Ανάπτυξη ευαίσθητου CBA για την ανίχνευση α3-nAChR αντισωμάτων / Βελτιστοποίηση συνθηκών .....	66
4.3	Επώαση ορών ασθενών με κύτταρα που εκφράζουν τον α3-nAChR με την μέθοδο CBA και σύγκριση με την μέθοδο RIPA .....	68
4.4	Ανωτερότητα του CBA στην ανίχνευση αντι-α3 σύμφωνα με τον κλινικό χαρακτηρισμό ασθενών .....	71
4.5	Κατηγορίες των IgGs και υποκατηγορίες των αντισωμάτων έναντι του α3-nAChR που προσδιορίζονται από το CBA .....	73
4.6	Ανάπτυξη ευαίσθητου CBA για την ανίχνευση α4-nAChR αντισωμάτων/ Βελτιστοποίηση συνθηκών .....	74
4.7	Ταυτοποίηση θετικών ορών για αντισώματα έναντι των α4-nAChRs με την μέθοδο CBA .....	76
4.8	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ MOGAD .....	79
4.8.1	Επιδημιολογικά δεδομένα .....	79
4.8.2	Εργαστηριακά δεδομένα ασθενών με αντι-MOG αντισώματα .....	79
4.8.3	Υποτροπές και ανταπόκριση στην θεραπεία .....	80
4.8.4	Σύγκριση του IgG1-CBA με τα άλλα δύο επικρατή CBA .....	81
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	84
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	94
7	ABSTRACT .....	106
8	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	108

<b>Πίνακας 1.</b> Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας και ρυθμιστικά διαλύματα .....	49
<b>Πίνακας 2.</b> Συνιστώμενος αριθμός κυττάρων πριν την διαμόλυνση ανάλογα με τον τύπο του δοχείου.....	55
<b>Πίνακας 3.</b> Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των RIPA-θετικών ασθενών. Κλινικά χαρακτηριστικά τίτλων α3-CBA και RIPA.....	65
<b>Πίνακας 4.</b> Αναζήτηση βέλτιστων συνθηκών για το α3β4-nAChR CBA.....	67
<b>Πίνακας 5 .</b> Κλινικές πληροφορίες ασθενών με υποψία AAG, θετικοί για αντισώματα έναντι του α3-nAChR. ....	72
<b>Πίνακας 6.</b> Τάξη και υποτάξη ανοσοσφαιρίνης των CBA θετικών ορών.....	74
<b>Πίνακας 7.</b> Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των αντι-α4β2 θετικών ασθενών .....	78
<b>Πίνακας 8.</b> Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ασθενών και με τα τρία CBA.....	82
<b>Εικόνα 1:</b> Η δομή και τα μονοπάτια σηματοδότησης των mAChRs και nAChRs.....	6
<b>Εικόνα 2.</b> Νευρωνικοί υπότυποι των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης.....	11
<b>Εικόνα 3.</b> Σχηματική αναπαράσταση μίας νευρικής σύναψης.....	12
<b>Εικόνα 4.</b> Περιοχές του εγκεφάλου όπου εκφράζονται οι διάφοροι τύποι νευρωνικών nAChRs.....	13
<b>Εικόνα 5.</b> Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογίας της βαριάς μυασθένειας .....	19
<b>Εικόνα 6.</b> Αρχή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης λουσιφεράσης (Luciferase Immunoprecipitation System/LIPS) .....	28
<b>Εικόνα 7.</b> Απεικόνιση των θέσεων έκφρασης των πρωτεϊνών AQP4 και MOG στο ΚΝΣ.....	36
<b>Εικόνα 8.</b> Απεικόνιση των θέσεων έκφρασης της πρωτεΐνης MOG στο ΚΝΣ..	38
<b>Εικόνα 9.</b> Σχηματική αναπαράσταση της πλασμιδιακής επιμόλυνσης σε πλακίδιο 6 θέσεων .....	57
<b>Εικόνα 10.</b> Αρχής της μεθόδου του κυτταρικού ανοσοθροισμού.....	60
<b>Εικόνα 11.</b> Αρχή της διαδικασίας ραδιοανοσοκαθίζησης (RIPA) .....	61
<b>Εικόνα 12.</b> Βελτιστοποίηση της διαδικασίας α3-nAChR CBA .....	68
<b>Εικόνα 13.</b> Το βελτιωμένο α3-nAChR CBA ανιχνεύει αντισώματα ορών με υψηλό ή χαμηλό τίτλο στην RIPA, ειδικά για ασθενείς με AAG.....	69
<b>Εικόνα 14.</b> Βελτιστοποίηση της διαδικασίας α4β2-nAChR CBA .....	75
<b>Εικόνα 15.</b> Ανίχνευση αντι-α4 nAChRs αντισωμάτων σε δείγματα ασθενών ..	77
<b>Γράφημα 1.</b> Συσχέτιση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι του α3-nAChR μεταξύ RIPA και CBA για 15 ασθενείς με αυτοάνοση αυτόνομη γαγγλιονοπάθεια (AAG) .....	70
<b>Γράφημα 2.</b> Συσχέτιση των αντι-MOG τίτλων με τις κλινικές διακυμάνσεις (υποτροπή και ύφεση) των ασθενών .....	80

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

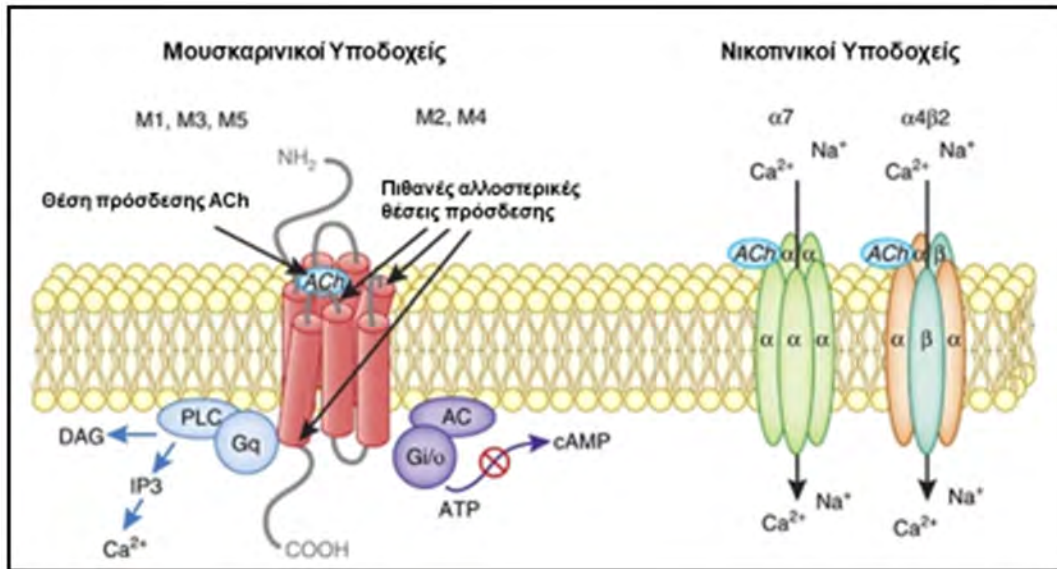
## 1.1 ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΩΝΙΚΟΙ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ

### 1.1.1 Χολινεργικοί υποδοχείς

Οι χολινεργικοί υποδοχείς λειτουργούν στην μεταγωγή σήματος του σωματικού και αυτόνομου νευρικού συστήματος. Οι υποδοχείς ονομάζονται έτσι επειδή ενεργοποιούνται από τον προσδέτη ακετυλοχολίνη (ACh), η οποία συντίθεται, αποθηκεύεται και εκκρίνεται από χολινεργικούς νευρώνες. Ανάλογα με τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες και τη συγγένεια πρόσδεσης που εμφανίζουν σε μόρια-προσδέτες, οι AChRs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες (**εικόνα 1**):

1. Μουσκαρινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (mAChRs) με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για μουσκαρίνη και μέλη της ευρύτερης οικογένειας υποδοχέων οι οποίοι συνδέονται με G-πρωτεΐνες<sup>1,2</sup>. Υπάρχουν 5 διαφορετικοί υπότυποι (M1-M5). Οι υπότυποι M1, M3 και M5 βρίσκονται σε σύζευξη με την Gq11 ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), ενώ οι υπότυποι M2 και M4 βρίσκονται σε σύζευξη με τις Gi και Go και αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση, ελαττώνουν τα ποσά του cAMP, ενεργοποιούν τα κανάλια K<sup>+</sup> και αναστέλλουν τους διαύλους Ca<sup>2+</sup>.

2. Νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs) με υψηλή απόκριση παρουσία νικοτίνης<sup>3,4</sup>. Είναι διάυλοι ιόντων και η ενεργοποίησή τους αυξάνει την διαπερατότητα ιόντων Na<sup>+</sup> και Ca<sup>2+</sup>. Βρίσκονται στις σκελετικές νευρομυϊκές συνάψεις, τα αυτόνομα γάγγλια, το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και σε μη νευρωνικούς ιστούς.



**Εικόνα 1: Η δομή και τα μονοπάτια σηματοδότησης των mAChRs και nAChRs.** Κάθε υπότυπος mAChR είναι μία επταμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Οι M1, M3 και M5 mAChRs, συνδέονται επιλεκτικά με τις τύπου Gq/G11 G-πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και 1,2-διακυλογλυκερόλης (DAG), μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης-Cβ που οδηγεί σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου. Οι M2 και M4 mAChRs ενεργοποιούν τις τύπου Gi/Go G-πρωτεΐνες, αναστέλλοντας έτσι την αδενυλική κυκλάση, μειώνοντας την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP και παρατείνουν το άνοιγμα των καναλιών καλίου. Οι nAChRs είναι πενταμερείς δίαυλοι ιόντων που καλύπτονται από προσδέτη. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι πιο ευρέως εκφραζόμενοι νευρωνικοί νικοτινικοί υποδοχείς. Ο α7 nAChR παρουσιάζει υψηλή διαπερατότητα σε ασβέστιο σε σχέση με τον ετερομερή α4β2<sup>5</sup>.

Οι δύο ομάδες υποδοχέων διαφέρουν ως προς την λειτουργία τους. Οι νικοτινικοί υποδοχείς λειτουργούν μέσα στο ΚΝΣ και στη νευρομυϊκή σύναψη, ενώ οι μουσκαρινικοί υποδοχείς λειτουργούν τόσο στο περιφερικό όσο και στο ΚΝΣ, μεσολαβώντας στην νεύρωση των σπλαχνικών οργάνων<sup>6</sup>. Η διαφορά στην μεταγωγή σήματος των δύο τύπων υποδοχέα, προσδίδει ξεχωριστές φυσιολογικές λειτουργίες κατά την ενεργοποίηση του κάθε τύπου.

Λόγω της διάχυτης παρουσίας χολινεργικών υποδοχέων, η δυσλειτουργία τους μπορεί να επιφέρει διάφορα αποτελέσματα. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς μεσολαβούν στην αυτόνομη λειτουργία όλων των κύριων οργανικών συστημάτων. Ωστόσο, υποδοχείς υπάρχουν επίσης σε όλο το ΚΝΣ. Η μη φυσιολογική λειτουργία των χολινεργικών υποδοχέων έχει δείξει συσχέτιση με ασθένειες όπως, η νόσος Alzheimer, Parkinson, η σχιζοφρένεια και η επιληψία. Εξαιτίας της εμπλοκής των υποδοχέων σε ένα ευρύ και ποικίλο φάσμα

ασθενειών, οι ιατρικές θεραπείες που στοχεύουν σε αυτούς, αποτελούν πεδίο έρευνας με εξέχουσα σημασία<sup>6</sup>.

### 1.1.2 Νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs)

Οι nAChRs αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας των ιοντικών καναλιών τα οποία τίθενται σε λειτουργία παρουσία νευροδιαβιβαστή (LGICs: Ligand-gated ion channels). Η υπεροικογένεια αυτή, εκτός από τους nAChRs νευρικού και μυϊκού τύπου, περιλαμβάνει τους υποδοχείς της 5-υδροξυτρυπταμίνης τύπου 3 (5-HT<sub>3</sub>), τους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος τύπου A και C (GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>C</sub>), τους υποδοχείς της γλυκίνης καθώς και τους υποδοχείς των σπονδυλωτών του γλουταμικού και της ιστιδίνης<sup>7</sup>. Τα ιοντικά αυτά κανάλια συγκροτούνται από πέντε ομόλογες υπομονάδες, οι οποίες διατάσσονται περιμετρικά ενός μεμβρανικού κεντρικού υδατο-πληρούμενου πόρου στην κυτταρική μεμβράνη, διαμέσου του οποίου διακινούνται ιόντα σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους κλίση. Οι υπομονάδες των παραπάνω υποδοχέων φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο χαρακτηριστική θηλιά 13 αμινοξικών καταλοίπων μεταξύ δύο συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης συνδεόμενων με δισουλφιδικό δεσμό<sup>8-10</sup>. Οι nAChRs μπορεί να είναι (α) μυϊκού τύπου και εντοπίζονται στις μετασυναπτικές μεμβράνες των νευρομυϊκών συνάψεων των σπονδυλωτών ή (β) νευρικού τύπου, εντοπιζόμενοι κυρίως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών και των εντόμων αλλά και σε πολλούς άλλους ιστούς.

### 1.1.3 Μυϊκός και μυϊκού τύπου nAChR

Οι μυϊκοί nAChRs απαντώνται στις μετασυναπτικές μεμβράνες των νευρομυϊκών συνάψεων των σκελετικών μυών των σπονδυλωτών. Οι μυϊκού τύπου nAChRs απαντώνται στα ηλεκτρικά όργανα ιχθύων του γένους *Torpedo* και *Electrophorus* και είναι ομόλογοι των μυών. Οι μυϊκοί και μυϊκού τύπου nAChRs σχηματίζουν ετεροεπενταμερή με στοιχειομετρία υπομονάδων (α)<sub>2</sub>βγδ στο *Torpedo* και (α<sub>1</sub>)<sub>2</sub>β<sub>1</sub>γδ ή (α<sub>1</sub>)<sub>2</sub>β<sub>1</sub>εδ στα εμβρυικά ή ενήλικα άτομα θηλαστικών, αντίστοιχα<sup>1,2</sup>. Η αντικατάσταση της γ- από την ε- υπομονάδα,

ξεκινά αμέσως μετά την γέννηση και ολοκληρώνεται μέσα στις δύο πρώτες εβδομάδες μετά από αυτή <sup>11</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι στους εξωτερικούς οφθαλμικούς μύες των ενήλικων θηλαστικών εκφράζονται τόσο η  $\gamma$  όσο και η  $\epsilon$  υπομονάδα<sup>12</sup>. Η μεταστροφή τύπου του υποδοχέα που χαρακτηρίζει τα θηλαστικά, συνεπάγεται και μια σειρά αλλαγών στα μεταβολικά και φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του, καθώς και στην αγωγιμότητα του ιοντικού καναλιού. Έτσι, ο εμβρυικού τύπου μυϊκός nAChR παρουσιάζει χαμηλή αγωγιμότητα και μεγαλύτερη διάρκεια επαγόμενου ρεύματος, ενώ ο ενήλικου τύπου nAChR αποτελεί κανάλι υψηλής αγωγιμότητας με επαγόμενο ρεύμα μικρότερης διάρκειας<sup>13</sup>.

Οι μυϊκοί και μυϊκού τύπου nAChRs διαθέτουν δύο θέσεις πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης και άλλων χολινεργικών προσδετών στα εξωκυττάρια τμήματα (ExtraCellular Domains- ECDs). Η μία θέση πρόσδεσης σχηματίζεται μεταξύ της  $\alpha$  και της  $\gamma$  υπομονάδας (ή  $\epsilon$  στα ενήλικα άτομα), ενώ η άλλη σχηματίζεται μεταξύ της δεύτερης  $\alpha$  και της  $\delta$  υπομονάδας, καθιστώντας έτσι τις δύο  $\alpha$  υπομονάδες, μη ισότιμες <sup>14</sup>. Στο  $\alpha$ -ECD εδράζει επίσης η κύρια ανοσογόνος περιοχή (Main Immunogenic Region-MIR), έναντι της οποίας κατευθύνονται τα αντισώματα στην περίπτωση της βαριάς μυασθένειας.

Κάθε υπομονάδα του μυϊκού και μυϊκού τύπου nAChR κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο. Τα γονίδια των  $\alpha 1$ ,  $\gamma$  και  $\delta$  υπομονάδων του ανθρώπινου μυϊκού nAChR βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2<sup>15</sup>, ενώ τα γονίδια των  $\beta 1$  και  $\epsilon$  υπομονάδων στο χρωμόσωμα 17<sup>16</sup>. Ο παρατηρούμενος υψηλός βαθμός ομοιότητας μεταξύ των υπομονάδων υποδηλώνει ότι τα αντίστοιχα γονίδια προέκυψαν εξελικτικά από ένα κοινό προγονικό γονίδιο, πιθανόν μέσω διαδοχικών διπλασιασμών γονιδίων <sup>17,18</sup>

Ο μυϊκού τύπου nAChR αποτελεί το πλέον γνωστό και καλά μελετημένο μέλος της υπεροικογένειας των μορίων-υποδοχέων νευροδιαβιβαστών. Σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι συνέβαλαν στην εκτεταμένη μελέτη του είναι η δυνατότητα απομόνωσης μεγάλων ποσοτήτων λειτουργικού μυϊκού τύπου υποδοχέα από τα ηλεκτρικά όργανα ιχθύων του γένους *Torpedo* και *Electrophorus*, καθώς και η ύπαρξη ειδικών μορίων-προσδετών (νευροτοξίνες φιδιών) για τη σήμανση και καθαρισμό του μορίου.

#### 1.1.4 Οι νευρωνικοί νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης

Οι νευρωνικοί nAChRs αποτελούν μία ετερογενή ομάδα ιοντικών διαύλων οι οποίοι εκφράζονται ευρέως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα σπονδυλωτών και εντόμων, στα περιφερικά γάγγλια, καθώς και σε μη διεγέρσιμα κύτταρα, όπως είναι τα κύτταρα του επιθηλίου και του ανοσοποιητικού συστήματος. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί εννέα διαφορετικές υπομονάδες τύπου  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) και τρεις υπομονάδες τύπου  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ )<sup>19,20</sup>. Εκτός από την  $\alpha 8$  υπομονάδα, η οποία έχει βρεθεί μόνο στην όρνιθα<sup>21</sup>, όλες οι άλλες υπομονάδες προέρχονται από διάφορα είδη, μεταξύ αυτών και του ανθρώπου.

Η ταξινόμηση των νευρικών υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$ , έγινε με βάση την ομολογία των αμινοξέων που παρουσιάζει η κάθε υπομονάδα με τις αντίστοιχες υπομονάδες του μυϊκού υποδοχέα, ενώ η αρίθμηση τους προκύπτει σύμφωνα με την χρονική σειρά που απομονώθηκαν και αναλύθηκε η αμινοξική τους σύσταση.

Οι νευρωνικοί nAChRs απαντούν είτε ως ετεροπενταμερή, αποτελούμενα από δύο ή περισσότερες υπομονάδες τύπου  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) και από δύο ή περισσότερες υπομονάδες τύπου  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), είτε ως ομοπενταμερή, τα οποία συγκροτούνται από  $\alpha$ -υπομονάδες ( $\alpha 7$ - $\alpha 9$ ).

Όλες οι υπομονάδες έχουν ένα κοινό αρχιτεκτονικό μοτίβο, αποτελούμενο από μία μεγάλη αμινο-εξωκυττάρια περιοχή (N-περιοχή), ακολουθούμενη από τρεις υδροφοβικές διαμεμβρανικές περιοχές (M1-M3), μία μεγάλη κυτταροπλασματική θηλιά μεταξύ M3 και M4, μία τέταρτη υδροφοβική διαμεμβρανική περιοχή (M4) και μία μικρή καρβοξυ-εξωκυττάρια περιοχή (C-περιοχή)<sup>22</sup>. Οι M1-M4 διαμεμβρανικές περιοχές είναι διατεταγμένες σε ομόκεντρα στρώματα γύρω από τον κεντρικό πόρο, η περιοχή M2 ευθυγραμμίζει την μεμβράνη του πόρου, οι M1 και M3 περιοχές θωρακίζουν την M2 από την περιβάλλουσα λιπιδική διπλοστιβάδα, ενώ η M4 είναι η πιο εκτεθειμένη σε λιπίδια περιοχή<sup>22</sup> (**εικόνα 2**).

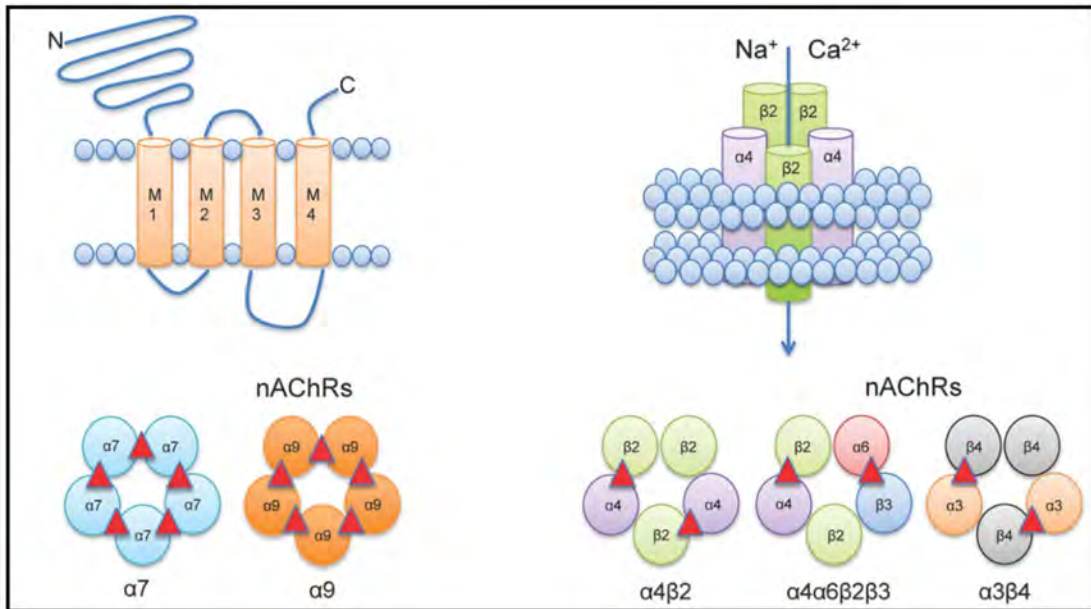
Η ύπαρξη πολλών και διαφορετικών τύπων του νευρωνικού nAChR είναι κυρίως αποτέλεσμα της ποικιλίας συνδυασμών μεταξύ των  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδων<sup>20</sup>. Στους ετεροπενταμερείς νευρωνικούς nAChRs σχηματίζονται δύο θέσεις πρόσδεσης χολινεργικών προσδετών μεταξύ των  $\alpha$  και  $\beta$

υπομονάδων, ενώ στους ομοπενταμερείς σχηματίζονται πέντε θέσεις πρόσδεσης μεταξύ των  $\alpha$  υπομονάδων τους.

Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των ετεροπενταμερών και ομοπενταμερών νευρωνικών nAChRs διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Έτσι, οι ετεροπενταμερείς νευρωνικοί nAChRs, εμφανίζουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης αγωνιστών (της τάξεως των nM), ενώ δεν προσδέουν τον ανταγωνιστή  $\alpha$ -μπουγκαροτοξίνη ( $\alpha$ -bgtx), σε αντίθεση με τους ομοπενταμερείς νευρωνικούς nAChRs ( $\alpha$ 7- $\alpha$ 9), οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλότερη μεν συγγένεια πρόσδεσης αγωνιστών (της τάξεως των  $\mu$ M), αλλά υψηλή συγγένεια πρόσδεσης  $\alpha$ -bgtx (της τάξεως των nM) <sup>23</sup>. Μάλιστα, για αυτό το λόγο, οι ομοπενταμερείς νευρωνικοί nAChRs αναφέρονται και ως  $\alpha$ -bgtx nAChRs.

Οι λειτουργικές ιδιότητες κάθε υπότυπου είναι μοναδικές, αλλά επικαλύπτονται επαρκώς ώστε να είναι πολύ δύσκολο να διακριθούν χρησιμοποιώντας φαρμακολογικούς παράγοντες, ειδικά όταν οι υπότυποι έχουν κοινές υπομονάδες με υψηλό βαθμό ομολογίας (π.χ  $\alpha$ 3 και  $\alpha$ 6 ή  $\alpha$ 2 και  $\alpha$ 4) <sup>22</sup>.

Οι nAChRs δεν είναι μόνο διαπερατοί στα μονοσθενή ιόντα  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ , αλλά και στα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  (**εικόνα 2**). Η ετερόλογη έκφραση των μονομερών  $\alpha$ 7 και  $\alpha$ 9 nAChRs, αποκάλυψε ένα κλασματικό ρεύμα  $\text{Ca}^{2+}$ , συγκρίσιμο με αυτό των υποδοχέων N-μέθυλο-D-ασπαρτικού (NMDA) γλουταμικού, αλλά περισσότερο διαπερατό στα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  από αυτό των ετερομερών nAChRs <sup>24</sup>. Η ικανότητα των nAChRs να μεταβάλλουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου, οδηγεί στην ενεργοποίηση διαφορετικών ενδοκυτταρικών μονοπατιών που μπορούν να διαδραματίσουν κεντρικό ρόλο στην νευρωνική σηματοδότηση και πλαστικότητα<sup>25</sup>.



**Εικόνα 2. Νευρωνικοί υπότυποι των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης:** Οι πιο ευρέως εκφραζόμενοι νευρωνικοί υπότυποι των υποδοχέων στον εγκέφαλο είναι οι ετερομερείς  $\alpha 4\beta 2^*$  (\*σημαίνει ότι μπορεί να υπάρχουν επιπλέον υπομονάδες) και οι ομομερείς  $\alpha 7$  υποδοχείς, ενώ οι  $\alpha 3\beta 4$  υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Εκτός από αυτούς που έχουν διαφορετικούς συνδυασμούς υπομονάδων, μερικοί υποδοχείς έχουν τον ίδιο συνδυασμό αλλά διαφορετική στοιχειομετρία, όπως στην περίπτωση των  $\alpha 4\beta 2$  και  $\alpha 3\beta 4$  <sup>22</sup>.

Η μεγάλη ποικιλία των υπότυπων νευρωνικών nAChRs, με διαφορετικές φυσιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες, ευθύνεται για τη συμμετοχή τους σε πολλές και διαφορετικές λειτουργίες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, όπως είναι ο έλεγχος της έκκρισης νευροδιαβιβαστικών ουσιών, ο έλεγχος των εκούσιων κινήσεων, η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, καθώς και η ρύθμιση πολύπλοκων ανώτερων πνευματικών διεργασιών, όπως είναι η μνήμη, η μάθηση και η συμπεριφορά<sup>26</sup>.

### 1.1.5 Λειτουργία νευρωνικών nAChRs

Οι νευρωνικοί nAChRs συναντώνται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, όπου κατανέμονται σε προ-, περι- και μετα-συναπτικές θέσεις<sup>27</sup> και ο ρόλος τους είναι στη μεταβίβαση των νευρικών ώσεων μεταξύ των νευρώνων. Οι προ- και περι-συναπτικοί υποδοχείς ρυθμίζουν την έκλυση σειράς σημαντικών νευροδιαβιβαστών, όπως η ακετυλοχολίνη (ACh), η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη, το γλουταμινικό οξύ, η 5-υδρόξυ-τρυπταμίνη (5-HT<sub>3</sub>) και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ σε διάφορες θέσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος

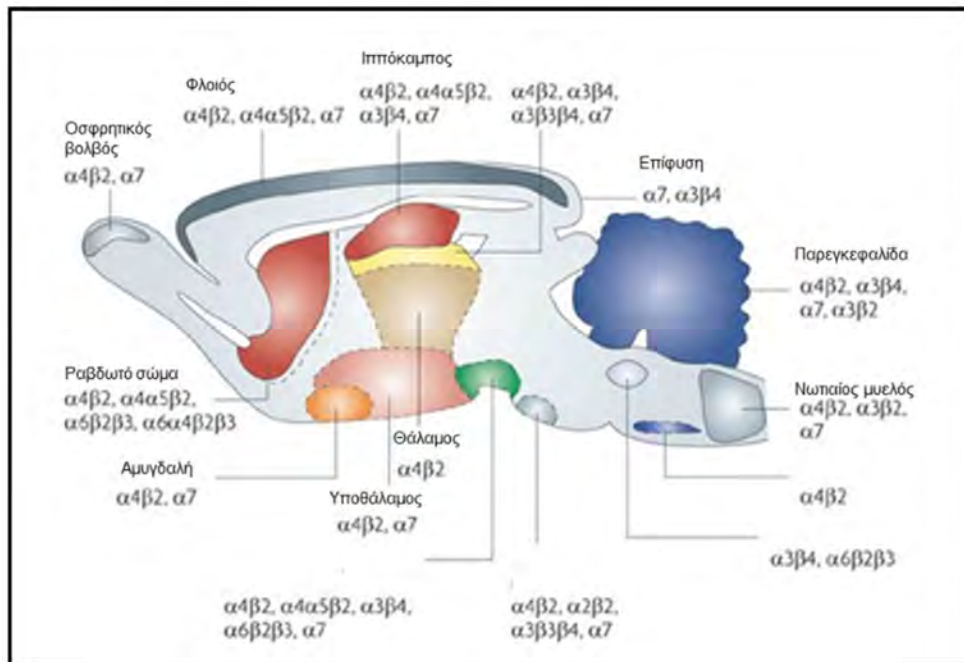
(ΚΝΣ). Αυτοί οι νευροδιαβιβαστές είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση των νευρικών ώσεων δια μέσου των συνάψεων. Η προσυναπτική μεμβράνη μίας σύναψης διαχωρίζεται από τη μετασυναπτική μεμβράνη με μία σχισμή (περίπου 50nm), η οποία ονομάζεται μετασυναπτική σχισμή. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συναπτική απελευθέρωση συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή, σε διαφορετικές περιοχές του Κ.Ν.Σ, είναι δυνατόν να διαμεσολαβείται από διαφορετικό τύπο νευρωνικού nAChR<sup>28,29</sup>. Εξάιρεση σε αυτό αποτελεί ο έλεγχος της απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος που είναι αυστηρά ελεγχόμενος από τον  $\alpha 7$  nAChR<sup>28</sup>. Οι μετασυναπτικοί νευρωνικοί nAChRs εμπλέκονται στην ταχεία διεγερτική νευροδιαβίβαση στο ΚΝΣ, αλλά γενικά θεωρούνται μειωμένης σημαντικότητας συγκριτικά με τους προσυναπτικούς και περισυναπτικούς νευρωνικούς υποδοχείς (**εικόνα 3**). Παρόλο που ο εντοπισμός θέσεων στον εγκέφαλο, όπου η απελευθέρωση ACh παράγει ταχείες μετασυναπτικές αποκρίσεις, είναι δύσκολος, εντούτοις έχει πιστοποιηθεί η παρουσία μετασυναπτικών  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$  και  $\alpha 3\beta 4$  νευρωνικών υποδοχέων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου<sup>28</sup>.



**Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση μίας νευρικής σύναψης.** Διακρίνονται: α) προ- και μετα-συναπτικός υποδοχέας, β) η συναπτική σχισμή μεταξύ τους, γ) τα συναπτικά κυστίδια στις απολήξεις του προσυναπτικού νευρώνα που μεταφέρουν μόρια νευροδιαβιβαστή (ACh) και δ) διάφορες θέσεις νευρωνικών nAChRs (<https://slideplayer.gr/slide/17548134/>)

Η έκφραση μεγάλης ποικιλίας νευρωνικών nAChRs κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης, καθώς και η ύπαρξη ενός πρωτογενούς μηχανισμού που επιτρέπει τόσο την σύνθεση ACh όσο και την απόκριση σε αυτή, μαρτυρούν ένα σημαντικό ρόλο της χολινεργικής σηματοδότησης κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος<sup>30,31</sup>.

Οι νευρωνικοί nAChRs θεωρείται ότι εμπλέκονται και στις διάφορες γνωστικές διεργασίες, όπως αυτές της μάθησης και της μνήμης. Στην περιοχή του ιππόκαμπου στον εγκέφαλο, όπου λαμβάνει χώρα η κωδικοποίηση και ανάκληση πληροφοριών έχουν εντοπιστεί τρεις τουλάχιστον λειτουργικά διακριτοί nAChRs, με σημαντική λειτουργία ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ )<sup>32</sup>.



**Εικόνα 4. Περιοχές του εγκεφάλου όπου εκφράζονται οι διάφοροι τύποι νευρωνικών nAChRs.** Οι nAChRs εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές του φλοιού, την φαιά ουσία, τα βασικά γάγγλια, τον θάλαμο, την παρεγκεφαλίδα και τον ιππόκαμπο. Οι  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$  και  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs είναι αυτοί που επικρατούν.<sup>33</sup>

Εκτός από τον αδιαμφισβήτητο ρόλο των νευρωνικών nAChRs στο νευρικό σύστημα, έχει πιστοποιηθεί η έκφραση τους και σε μη διεγέρσιμους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, λιποκύτταρα, κερατινοκύτταρα, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και των πνευμόνων<sup>34,35</sup>. Πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν την σημαντική συνεισφορά των νευρωνικών nAChRs των μακροφάγων κυττάρων

σε διαδικασίες καταστολής της φλεγμονώδους αντίδρασης<sup>36</sup> καθώς και τη συμμετοχή τους στην αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και στις διεργασίες της αγγειογένεσης, συμπεριλαμβανομένης και της αγγειογένεσης σε καρκινικούς όγκους<sup>37</sup>.

### 1.1.6 Πρόσδεση υποκαταστατών στον nAChR

Τα χημικά μόρια που προσδένονται στον nAChR (προσδέτες), διακρίνονται σε αγωνιστές, ανταγωνιστές και αλλοστερικούς υποκαταστάτες, ανάλογα με την θέση πρόσδεσης και τον τρόπο που επηρεάζουν την λειτουργία του ιοντικού καναλιού.

1. Οι αγωνιστές προσδένονται σε θέση ίδια με την θέση πρόσδεσης της ACh και έχουν ίδια δράση με αυτή, δηλαδή επάγουν την λειτουργία του καναλιού.

2. Οι ανταγωνιστές προσδένονται επίσης, σε θέση ίδια με την θέση πρόσδεσης της ACh αλλά έχουν αντίθετη δράση από αυτή. Παρεμποδίζουν την σύνδεση της ACh και κατ'επέκταση αναστέλλουν τη λειτουργία του ιοντικού καναλιού, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τη συναπτική διαβίβαση.

3. Οι αλλοστερικοί υποκαταστάτες προσδένονται σε ρυθμιστικές θέσεις διαφορετικές από τη θέση πρόσδεσης της ACh και αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μορίων, που μπορούν είτε να ενεργοποιούν είτε να αναστέλλουν τη λειτουργία του υποδοχέα.

#### 1.1.6.1 Αγωνιστές του nAChR

- **Ακετυλοχολίνη:** Το μόριο της ACh αποτελεί τον ενδογενή φυσιολογικό αγωνιστή του υποδοχέα και προκαλεί τη διέγερση του μετασυναπτικού νευρώνα στη νευρομυϊκή σύναψη, αλληλεπιδρώντας με τον nAChR.
- **Επιβατιδίνη:** Μέχρι σήμερα, ο πιο ισχυρός αγωνιστής της ACh είναι η επιβατιδίνη. Η επιβατιδίνη, είναι ένα αλκαλοειδές που έχει απομονωθεί από το δέρμα του δηλητηριώδους βατράχου

*Eripedobates tricolor*. Έχει την ικανότητα να προσδένεται με μεγάλη συγγένεια τόσο σε ετερο-ολιγομερείς όσο και σε ομο-ολιγομερείς υπότυπους του νευρωνικού υποδοχέα. Πειράματα έκφρασης νευρωνικών υποδοχέων σε ωκύτταρα *Xenopus* έδειξαν ότι, και οι δύο ισομερείς μορφές της επιβατιδίνης που υπάρχουν, συμπεριφέρονται ως πολύ ισχυροί αγωνιστές της ACh στους υπότυπους  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$  και  $\alpha 8$  του υποδοχέα του κοτόπουλου <sup>38</sup>. Η συγγένεια των παραπάνω υποτύπων του υποδοχέα για την επιβατιδίνη είναι 1000 φορές μεγαλύτερη από τη συγγένεια που εμφανίζουν οι υποδοχείς αυτοί για τη νικοτίνη ή την ACh.

- **Νικοτίνη:** Πρόκειται για αλκαλοειδές από το φυτό *Nicotiana tabacum*. Προσδένεται σε μυϊκούς καθώς και σε ορισμένους νευρωνικούς nAChRs. Συγκεκριμένα προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια σε νευρωνικούς υποδοχείς και ειδικότερα στους ετεροπενταμερείς τύπου  $\alpha 4\beta 2$  οι οποίοι μάλιστα συνεισφέρουν σημαντικά στην εξάρτηση που προκαλεί η νικοτίνη. Η υψηλή συγγένεια του μορίου της νικοτίνης για πρόσδεση με υποδοχείς τύπου  $\alpha 4\beta 2$  καθώς επίσης και το χαρακτηριστικό της να διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθιστούν αυτό το μόριο δραστικό για το κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλώντας ευφορία και εξάρτηση. Επιπλέον, οι υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν στην εισπνεόμενη νικοτίνη να δράσει ως εσωκυτταρικό συνοδό μόριο των  $\alpha 4\beta 2$  υποδοχέων επάγοντας με αυτό το τρόπο την αύξηση του αριθμού των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων<sup>39</sup>.
- **Καρβαμυλοχολίνη:** Αποτελεί ιδιαίτερα σταθερό αγωνιστή, τόσο των νικοτινικών όσο και των μουσκαρινικών AChRs, ο οποίος παρεμποδίζει τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE)<sup>40</sup>.
- **Κυτισίνη:** Η κυτισίνη είναι ένα αλκαλοειδές, το οποίο μοιάζει πολύ με την νικοτίνη. Έχει την ικανότητα να προσδένεται με διαφορετική συγγένεια σε διάφορους ετερο-ολιγομερείς  $\alpha/\beta$  υπότυπους του νευρωνικού υποδοχέα και δρα άλλοτε ως ανταγωνιστής και άλλοτε

ως αγωνιστής της ακετυλοχολίνης. Για τον λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για το φαρμακολογικό χαρακτηρισμό υποτύπων του νευρωνικού υποδοχέα<sup>26,41</sup>.

### 1.1.6.2 Ανταγωνιστές του nAChR

- **α-μπουγκαροτοξίνη (α-bgtx):** Η α-bgtx απομονώθηκε από το δηλητήριο του φιδιού *Bungarus multisinctus*. Αποτελεί πολυπεπτιδίο 74 αμινοξέων και εμφανίζει πολύ υψηλή χημική συγγένεια για το μυϊκό nAChR. Λειτουργεί ως ανταγωνιστής της ACh και δύναται να αναστείλλει τη λειτουργία του ιοντικού καναλιού<sup>42,43</sup>. Ο αναταγωνιστής προσδένεται και σε ορισμένους υποτύπους του νευρωνικού AChR. Με την εφαρμογή συστημάτων ετερόλογης έκφρασης για υπομονάδες του νευρωνικού nAChR, διαπιστώθηκε πως ο ανταγωνιστής αλληλεπιδρά και συνδέεται με τους ομοπενταμερείς α7, α8, α9 nAChRs και μάλιστα με αρκετά υψηλή συγγένεια, ενώ αντίθετα δεν συνδέεται με τους ετεροπενταμερείς νευρωνικούς α<sub>x</sub>/β<sub>y</sub> και α7/α8 nAChRs.
- **κ-μπουγκαροτοξίνη (κ-bgtx):** Πρόκειται για ένα πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους ~6,5 kDa, το οποίο εμπεριέχεται στο δηλητήριο του φιδιού *Bungarus multisinctus*, σε πολύ μικρότερες όμως ποσότητες από την α-bgtx<sup>44</sup>. Η κ-bgtx αναστέλλει τη συναπτική διαβίβαση σε γάγγλια του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όπου εντοπίζονται διάφοροι ετεροπενταμερείς α<sub>x</sub>/β<sub>y</sub> υποτύποι του νευρωνικού nAChR<sup>26</sup>. Η ικανότητα της κ-bgtx να αναστέλλει τη λειτουργία νευρωνικών nAChRs στα γάγγλια, καταγράφηκε για πρώτη φορά σε μελέτες που έγιναν στα βλεφαριδικά γάγγλια οφθαλμών από κοτόπουλο<sup>44</sup>.
- **D-τουμποκουραρίνη:** Αποτελεί τη δραστική ουσία που απομονώνεται από το κουράριο, ένα μίγμα φυτικών τοξινών στο οποίο οι ιθαγενείς ινδιάνοι της νοτίου Αμερικής εμβάπτιζαν τα βέλη τους για να γίνουν περισσότερο αποτελεσματικά στο κυνήγι των άγριων ζώων. Αλληλεπιδρά κυρίως με τον μυϊκό και μυϊκού τύπου

nAChR, αλλά εμφανίζει δράση και σε ορισμένους υποτύπους νευρωνικού υποδοχέα.

## **1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ nAChRs ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ**

Οι nAChRs εμπλέκονται σε μια σειρά ασθενειών του ανθρώπινου οργανισμού. Η πιο γνωστή και καλύτερα χαρακτηρισμένη ασθένεια από αυτές είναι η αυτοάνοση βαριά μυασθένεια, στην οποία εμπλέκεται άμεσα ο μυϊκού τύπου nAChR.

Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται αναφορά στην παθοφυσιολογία της νευρομυϊκής σύναψης καθώς και στα πιθανά αίτια παθογένεσης της νόσου, καθώς και συνοπτική αναφορά στα μυασθενικά σύνδρομα τα οποία οφείλονται σε μεταλλάξεις του μυϊκού τύπου nAChR.

Τέλος, γίνεται εκτενής αναφορά στη συμμετοχή των νευρωνικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στην παθοφυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Τα πειραματικά ευρήματα της τελευταίας εικοσαετίας δείχνουν ότι οι νευρωνικοί nAChRs εμπλέκονται σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενειών του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος.

### **1.2.1 Ασθένειες οφειλόμενες στον μυϊκού τύπου nAChR**

#### **1.2.1.1 Βαριά μυασθένεια (Myasthenia Gravis)**

Η βαριά μυασθένεια (Myasthenia Gravis, MG) είναι ένα ετερογενές, ιδιοπαθές, αυτοάνοσο νόσημα το οποίο χαρακτηρίζεται από διαταραχή στη νευροδιαβίβαση στο επίπεδο της νευρομυϊκής σύναψης (NMJ). Χαρακτηριστικά της νόσου είναι η αδυναμία και η κόπωση των σκελετικών μυών.

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που πάσχουν από μυασθένεια (~85%) παράγονται αυτοαντισώματα έναντι του nAChR, τα οποία δεν ανιχνεύονται στο αίμα φυσιολογικών ατόμων. Έχει διαπιστωθεί ότι η πλειοψηφία των αντισωμάτων στοχεύει στην κύρια ανοσογόνο περιοχή (MIR) του nAChR, η οποία εδράζει στην εξωκυττάρια περιοχή (ΕΚΠ) της  $\alpha 1$  υπομονάδας, αλλά και

ότι η αλληλεπίδραση της MIR περιοχής με ορισμένα αντισώματα, εξαρτάται και από άλλες υπομονάδες<sup>45,46</sup>.

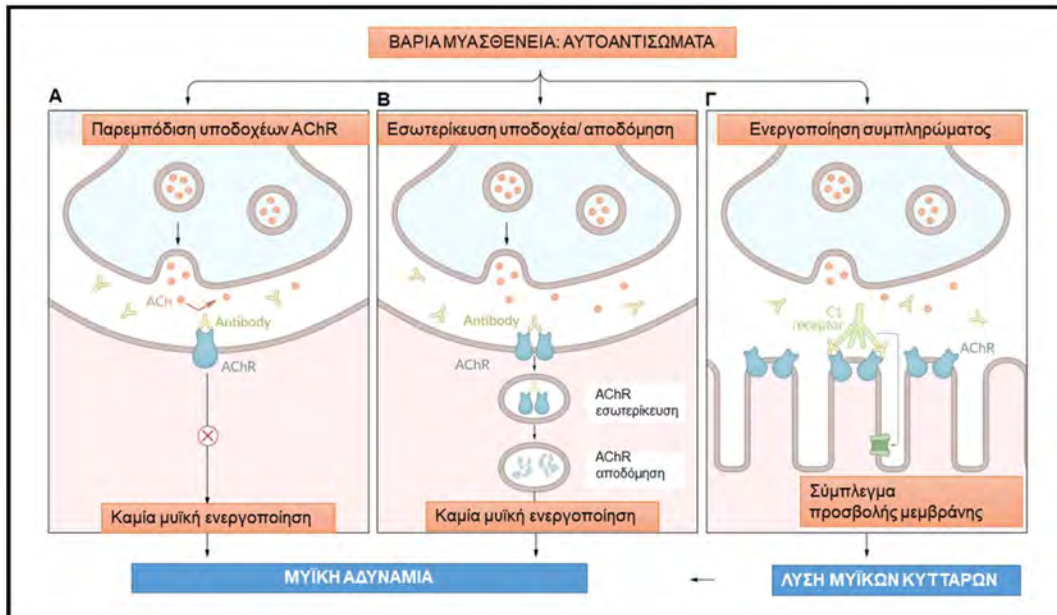
Προκαλείται κυρίως από αυτοαντισώματα έναντι του μυϊκού nAChR στο 80-90% περίπου των μασθενών με γενικευμένη μασθένεια και στο 50% με οφθαλμική και δευτερευόντως έναντι άλλων δομικών στοιχείων της νευρομυϊκής σύναψης, όπως της ειδικής μυϊκής κινάσης (MuSK) στο υπόλοιπο 5% περίπου, καθώς και άλλων στοιχείων σε μικρότερο ποσοστό.

Η δέσμευση των αυτοαντισωμάτων προκαλεί δυσλειτουργία της τελικής κινητικής πλάκας. Η ακριβής αιτία της αυτοάνοσης αυτής ανωμαλίας δεν είναι γνωστή αλλά είναι σχεδόν βέβαιο ότι σχετίζεται με ανωμαλίες του θύμου αδέν<sup>47</sup> και ότι υπάρχει πιθανή γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της μασθένειας<sup>48</sup>.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της ασθένειας είναι η αδυναμία και κόπωση των σκελετικών μυών. Η μυϊκή αδυναμία αυξάνεται με την κόπωση και τελικά καταλήγει σε κατάσταση ψευδο-παράλυσης. Οι μύες που πλήττονται περισσότερο είναι αυτοί που απαιτούνται για την στάση του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των μυών του προσώπου και των μυών του αυχένα, καθώς και οφθαλμικών μυών και των μυών που χρειάζονται για την ομιλία και την κατάποση<sup>49</sup>.

Τα κλινικά συμπτώματα μπορεί να περιορίζονται σε μια ομάδα μυών, ιδιαίτερα στους μύες των ματιών (οφθαλμική μασθένεια) ή να γενικεύονται (γενικευμένη μασθένεια). Η MG μπορεί να προκύψει από την πρώιμη παιδική ηλικία μέχρι και μεγαλύτερες ηλικίες.

Τα αυτοαντισώματα που παράγονται στην μασθένεια προκαλούν μείωση των διαθέσιμων nAChRs στις νευρομυϊκές συνάψεις μέσω των ακόλουθων μηχανισμών: α) επιταχυνόμενη ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση των nAChRs (αντιγονική τροποποίηση), β) λύση της μετασυναπτικής μεμβράνης μέσω της δράσης του συμπληρώματος και γ) άμεση παρεμπόδιση της λειτουργίας του nAChR (**εικόνα 5**).



**Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογίας της βαριάς μυασθένειας.** Τα αυτοαντισώματα που παράγονται στην νόσο, προκαλούν μείωση των διαθέσιμων nAChRs στις νευρομυϊκές συνάψεις μέσω των ακόλουθων μηχανισμών: Α) παρεμπόδιση της λειτουργίας των nAChRs. Τα αντισώματα παρεμποδίζουν την πρόσδεση της ACh στον υποδοχέα, αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό τη λειτουργία του ιοντικού διαύλου. Β) Η αντιγονική τροποποίηση του nAChR οφείλεται στην ικανότητα των αντισωμάτων να συνδέονται συγχρόνως σε δυο γειτονικά nAChR μόρια. Οι διασυνδεδεμένοι υποδοχείς δημιουργούν σύμπλοκα, τα οποία ενδοκυτταρώνονται με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τα μεμονωμένα μόρια και οδηγούνται στα λυσοσώματα όπου αποικοδομούνται. Γ) Η δέσμευση των αυτοαντισωμάτων της ACh, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τον σχηματισμό συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης, οδηγώντας στην καταστροφή της νευρομυϊκής σύναψης και στην λύση των μυϊκών κυττάρων. <https://www.amboss.com/us/knowledge/myasthenia-gravis>

### 1.2.1.2 Συγγενή μασθενικά σύνδρομα

Τα συγγενή μασθενικά σύνδρομα οφείλονται σε μεταλλάξεις που προκαλούν εξασθένηση της νευρομυϊκής διαβίβασης. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις εντοπίζονται στις υπομονάδες του μυϊκού nAChR (άλλες μεταλλάξεις εξασθενούν τη νευρομυϊκή διαβίβαση, επηρεάζοντας το πακετάρισμα και την έκκριση της ακετυλοχολίνης ή τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης). Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 60 μεταλλάξεις στις υπομονάδες του μυϊκού υποδοχέα<sup>50-53</sup>. Κάθε μετάλλαξη έχει

διαφορετική επίδραση στο φαινότυπο. Πολλοί άνθρωποι που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις, ζουν φυσιολογικά με μια μέτρια εξασθένηση της νευρομυϊκής διαβίβασης. Μερικοί από αυτούς αντιμετωπίζουν πρόβλημα μετά από λήψη μυοχαλαρωτικών φαρμάκων, που χορηγούνται κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης<sup>54</sup>. Άλλοι επιβιώνουν από θανατηφόρες μεταλλάξεις στο γονίδιο της  $\epsilon$  υπομονάδας, εκφράζοντας τη  $\gamma$  υπομονάδα του εμβρυϊκού υποδοχέα<sup>52-54</sup>. Μεταλλάξεις που μειώνουν τη συγγένεια του υποδοχέα για την ακετυλοχολίνη προκαλούν μείωση της δραστηριότητας του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται ο χρόνος που παραμένει ανοιχτό το ιοντικό κανάλι. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η  $\epsilon P121L$  στο γονίδιο που κωδικοποιεί στην εξωκυτταρική περιοχή της υπομονάδας και η  $\epsilon R311W$  στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αρχή της μεγάλης κυτταροπλασματικής περιοχής της υπομονάδας<sup>53</sup>. Οι μεταλλάξεις που μειώνουν το χρόνο ανοίγματος του ιοντικού καναλιού προκαλούν τα λεγόμενα σύνδρομα “γρήγορου καναλιού” (“fast channel” syndromes). Συνεπώς οι μεταλλάξεις αυτές εξασθενούν τη νευρομυϊκή διαβίβαση.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας. Τα άτομα που νοσούν από συγγενή μυσθενικά σύνδρομα φέρουν συνήθως διαφορετικές υπολειπόμενες μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα γονίδια της ίδιας υπομονάδας<sup>53,54</sup>.

### **1.2.2 Ασθένειες οφειλόμενες σε νευρωνικού τύπου nAChR**

Οι νευρωνικοί nAChRs είναι ευρέως κατανομημένοι στο νευρικό σύστημα και σε αρκετούς μη-νευρικούς ιστούς<sup>55,56</sup>. Ρυθμίζουν τη νευρωνική διεγερσιμότητα μέσω νευροδιαβιβαστών. Λόγω του κρίσιμου ρόλου τους, ευθύνονται για τον εθισμό στην νικοτίνη, ενώ η απώλεια ή δυσλειτουργία τους (όπως λόγω μεταλλάξεων) σχετίζεται με πολλές νευρολογικές και νευροψυχιατρικές ασθένειες, όπως Parkinson, Alzheimer, σχιζοφρένεια, επιληψία και κατάθλιψη<sup>33,57-60</sup>.

### 1.2.2.1 Νόσος του Alzheimer

Από τις πιο ευρέως γνωστές ασθένειες που σχετίζονται με διαταραχές των νευρωνικών τύπων υποδοχέων ακετυλοχολίνης είναι η νόσος του Alzheimer. Χαρακτηρίζεται από απώλεια της ικανότητας για μάθηση, απουσία μνήμης και έλλειψη προσοχής, ανησυχία και φόβο, ατονία και κατάπτωση.

Το κύριο ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο σχηματισμός σε μεγάλη έκταση πλακών αμυλοειδούς (πλάκες αμυλοειδούς είναι πιθανό να βρεθούν και σε εγκέφαλο φυσιολογικών ηλικιωμένων ατόμων), οι οποίες αποτελούνται κυρίως από συσσωματώματα ενός μικρού αδιάλυτου πεπτιδίου, του αμυλοειδούς β-πεπτιδίου. Το αμυλοειδές β-πεπτιδίο αποτελείται από 40-42 αμινοξικά κατάλοιπα και παράγεται με πρωτεολυτική πέψη από ένα πρόδρομο μόριο, την πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς. Ο σχηματισμός των πλακών του αμυλοειδούς β-πεπτιδίου συνοδεύεται από πολλαπλές επιπλοκές στον εγκέφαλο που οδηγούν σε εκτεταμένη δυσγενεσία (εκφυλισμό) του νευρικού ιστού<sup>61</sup>.

Μεταξύ των πολλαπλών αλλαγών, που συμβαίνουν στον εγκέφαλο των ασθενών με Alzheimer, διαπιστώνεται και η εκτεταμένη απώλεια των θέσεων που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τη νικοτίνη, γεγονός που δηλώνει την απώλεια μερικών υποτύπων του νευρωνικού nAChR<sup>62</sup>. Αρχικά, οι αιτίες παθογένεσης της νόσου είχαν αποδοθεί στους χολινεργικούς υποδοχείς του εγκεφάλου, σήμερα όμως θεωρείται περισσότερο πιθανό ότι τα χαρακτηριστικά της νόσου συνδέονται άμεσα με τις διαδικασίες έκφρασης και ενζυμικής πέψης της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς<sup>61</sup>. Παρ' όλα αυτά, η νικοτίνη εξακολουθεί να συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην προσπάθεια ανάπτυξης φαρμακολογικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση της νόσου καθώς: **i.** δεν υπάρχει διαθέσιμη μέχρι στιγμής κατάλληλη θεραπεία της νόσου και ο μοναδικός ενδεδειγμένος τρόπος αντιμετώπισης των συμπτωμάτων είναι η χορήγηση τακρίνης (αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης)<sup>61</sup>, **ii.** η νικοτίνη έχει αποδειχτεί ότι έχει ευεργετική επίδραση στη μάθηση, τη μνήμη, την προσοχή και το αίσθημα ανησυχίας και φόβου των ασθενών<sup>63,64</sup> και **iii.** όπως προαναφέρθηκε, ένα χαρακτηριστικό της νόσου είναι η απώλεια υποδοχέων της ακετυλοχολίνης. Έτσι, έχει γίνει προσπάθεια να παρασκευαστούν αγωνιστές ειδικοί για μερικούς υπότυπους του

νευρωνικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, οι οποίοι αναμένεται να βελτιώσουν τη νευρική διαβίβαση στον εγκέφαλο, ενεργοποιώντας προ- ή μετασυναπτικούς nAChRs. Οι αγωνιστές αυτοί πρέπει να είναι τριτοταγείς αμίνες για να εισχωρήσουν στον εγκέφαλο, να έχουν μικρή συγγένεια για τους μυϊκούς nAChRs για να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη διέγερση των μυών και επίσης να έχουν μικρή συγγένεια για τους α3 νευρωνικούς υποδοχείς για να αποφευχθούν παρενέργειες όπως γαστρεντερική δυσφορία, ναυτία, υποθερμία, αύξηση του καρδιακού ρυθμού και της πίεσης του αίματος, που εξαρτώνται από τη διέγερση των α3 υποδοχέων<sup>65</sup>.

### 1.2.2.2 Νόσος του Parkinson

Η νόσος του Parkinson είναι μια ασθένεια όπου χαρακτηριστικό της οποίας είναι η εκτεταμένη απώλεια νευρικών κυττάρων της φαιάς ουσίας που περιέχουν το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη (κατά συνέπεια μείωση του αριθμού των αδρενεργικών συνάψεων). Τα συμπτώματα της νόσου μπορούν να αντιμετωπιστούν παροδικά με τη χορήγηση του πρόδρομου μορίου της ντοπαμίνης L-3,4 διυδροξυφαινοϋλαλανίνη (L-DOPA), αλλά η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σταδιακά μειώνεται και παράλληλα είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει ψύχωση<sup>66</sup>. Η νόσος χαρακτηρίζεται επίσης από μεγάλη απώλεια (~ 50%) των θέσεων που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τη νικοτίνη, γεγονός που δηλώνει την απώλεια μερικών υποτύπων του νευρικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης<sup>62</sup>. Το κάπνισμα, ως μέσο χορήγησης νικοτίνης στον οργανισμό, έχει αποδειχτεί ότι είναι ο πιο ισχυρός περιβαλλοντικός παράγοντας που προσφέρει προστασία στην ευπάθεια από τη νόσο του Parkinson<sup>67</sup>. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στην προσπάθεια ανάπτυξης ειδικών αγωνιστών για κάθε υπότυπο του νευρωνικού nAChR ως πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες για τη νόσο του Parkinson<sup>68,69</sup>. Η νικοτίνη, λόγω των γαστρεντερικών και καρδιαγγειακών επιδράσεων που έχει στον οργανισμό, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας κατάλληλος για την αντιμετώπιση της νόσου. Ο κατάλληλος αγωνιστής θα πρέπει να έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί προ- και μετασυναπτικούς υποδοχείς, των οποίων η λειτουργία να προκαλεί απελευθέρωση ντοπαμίνης<sup>70</sup> και επιπλέον νευροπροστατευτική δράση<sup>71,72</sup>. Ο αγωνιστής SIB-1765F εμφανίζει μεγάλη

συγγένεια για τους α4β2 υποδοχείς, μικρή συγγένεια για τους α7 υποδοχείς και έχει την ίδια τουλάχιστον ικανότητα με τη νικοτίνη να προκαλεί απελευθέρωση ντοπαμίνης σε εγκεφάλους αρουραίων<sup>68,73</sup>. Ο SIB-1765F επάγει επίσης την απελευθέρωση νορεπινεφρίνης από τις περιοχές του φλοιού και του θαλάμου και ακετυλοχολίνης από το μετωπιαίο τμήμα του φλοιού και τον ιππόκαμπο, ενώ την ίδια επίδραση με το μόριο L-DOPA σε μοντέλα της νόσου του Parkinson σε πρωτεύοντα και αρουραίους<sup>68,69</sup>. Δεν είναι ξεκάθαρο ακόμη ποιος υπότυπος του νευρωνικού nAChR θα μπορούσε να είναι ο ιδανικός στόχος για έναν αγωνιστή του υποδοχέα με θεραπευτική δράση. Μέχρι πρόσφατα επίσης η α6 υπομονάδα δεν είχε βρεθεί να συμμετέχει σε κάποιο λειτουργικό υπότυπο του υποδοχέα. Τώρα πλέον είναι γνωστό ότι η α6 υπομονάδα σχηματίζει λειτουργικούς υποδοχείς όταν εκφράζεται μαζί με τη β4 υπομονάδα σε ωκύτταρα *Xenopus*<sup>74</sup>. Αν και η α6 υπομονάδα παρουσιάζει μεγάλη ομολογία στην πρωτοταγή δομή της με την α3 υπομονάδα, έχει διαφορετικά φαρμακολογικά χαρακτηριστικά από την τελευταία, γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξη φαρμάκων ειδικών για τους α6 υποδοχείς. Βέβαια, η σύσταση των υπομονάδων και τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά των φυσικών α6 υποδοχέων παραμένουν άγνωστα. Αν οι φυσικοί α6 υποδοχείς μοιάζουν με τους αββ4 υποδοχείς που εκφράζονται στα ωκύτταρα, και επίσης αν οι α6 υποδοχείς παίζουν κάποιο ρόλο στη νόσο του Parkinson, τότε αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο φαρμακολογικό στόχο με μια μεγάλη κατανομή στον εγκέφαλο και με ιδιαίτερα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά, που επιτρέπουν το σχεδιασμό ειδικών υποκαταστατών.

### 1.2.2.3 Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια είναι μια καταστρεπτική ετερογενής ψύχωση που εμφανίζεται σε προχωρημένη εφηβική ηλικία ή στα πρώτα στάδια της ενηλικίωσης και ακολουθεί μια συνεχώς επιδεινούμενη πορεία που χαρακτηρίζεται από παραισθήσεις, αυταπάτες, αλλόκοτη και ιδιότροπη συμπεριφορά, απάθεια, αδιαφορία και απότομη συγκίνηση<sup>75</sup>. Σύμφωνα με τη λεγόμενη “υπόθεση ντοπαμίνης” η σχιζοφρένεια προκαλείται από υπερβολική απελευθέρωση ντοπαμίνης στις αδρενεργικές συνάψεις του εγκεφάλου. Μερικά από τα παραπάνω συμπτώματα μπορούν επίσης να προκληθούν από

φάρμακα, όπως το PCP, τα οποία δρουν ως αναστολείς των γλουταμινικών υποδοχέων και των nAChRs. Οι μηχανισμοί παθογένεσης της σχιζοφρένειας παραμένουν άγνωστοι. Έχει προταθεί ότι οι α7 nAChRs είναι πιθανό να συνδέονται με μερικές πλευρές αυτής της ασθένειας<sup>76,77</sup>.

Οι περισσότεροι σχιζοφρενείς είναι μανιώδεις καπνιστές και θεωρείται πιθανό ότι χρησιμοποιούν ασυνείδητα το κάπνισμα ως μορφή αυτοθεραπείας. Η επίδραση όμως της νικοτίνης είναι μάλλον παροδική, καθώς είναι γνωστό ότι οι α7 υποδοχείς απευαισθητοποιούνται ταχύτατα. Επιπλέον, η έκφραση των α7 υποδοχέων στην περιοχή του ιππόκαμπου εμφανίζεται μειωμένη στον εγκέφαλο των σχιζοφρενών<sup>76</sup>. Οι σχιζοφρενείς παρουσιάζουν επίσης ένα χαρακτηριστικό σφάλμα στην ακουστική απόκριση, το οποίο είναι κληρονομικό και χαρτογραφείται στο γονίδιο της α7 υπομονάδας<sup>76</sup>. Το σφάλμα αυτό, το οποίο ονομάζεται έλλειψη P50, είναι μια μείωση στη φυσιολογική αναστολή της ακουστικής απόκρισης στο δεύτερο από ένα ζευγάρι ακουστικών ερεθισμάτων που λαμβάνονται. Έχει προταθεί ότι η έλλειψη P50 αντανakλά τις διαταραχές στη συγκέντρωση της σκέψης των σχιζοφρενών, στους οποίους η αδυναμία φιλτραρίσματος και διαχωρισμού των άσχετων ερεθισμάτων συμβάλλει στην ανάπτυξη των αυταπατών και των παραισθήσεων. Η έλλειψη P50 δεν θεωρείται ικανή από μόνη της να προκαλέσει την ανάπτυξη της νόσου, αποτελεί όμως παράγοντα προδιάθεσης για τη σχιζοφρένεια<sup>76</sup>. Στο πειραματικό μοντέλο της έλλειψης P50 σε αρουραίους, η α-Bungarotoxin (ανταγωνιστής των μυϊκών και των α7 υποδοχέων) αναστέλλει την είσοδο του δεύτερου από ένα ζευγάρι ακουστικών ερεθισμάτων και η αναστολή αυτή υποχωρεί μετά από χορήγηση νικοτίνης<sup>78</sup>. Η ετερογένεια αυτής της ασθένειας ή της ομάδας των ασθενειών που καλούνται ως σχιζοφρένεια καθιστά πολύ δύσκολη τη σύνδεσή της με ειδικές βιοχημικές βλάβες του εγκεφάλου. Ο πιθανός ρόλος των α7 nAChRs στη σχιζοφρένεια απαιτεί παραπέρα διερεύνηση.

### **1.2.3 Αυτοάνοση απόκριση στους νευρωνικούς nAChRs**

Παρά την υψηλή ανοσογονικότητα του μυϊκού nAChR, η επί του παρόντος διαθέσιμη γνώση, υποδηλώνει ότι η αυτοανοσία στους νευρωνικούς nAChRs είναι σπάνια, αν και περαιτέρω βελτιωμένες διαγνωστικές δοκιμασίες, θα μπορούσαν να αποκαλύψουν την παρουσία τέτοιων αντισωμάτων, σε μέχρι

τώρα «οροαρνητικά» αυτοάνοσα νοσήματα. Μέχρι στιγμής, η πιο συχνή και καλύτερα μελετημένη περίπτωση, είναι η αυτοάνοση απόκριση στους γαγγλιονικούς  $\alpha 3$  nAChRs, ενώ μόνο λίγες μελέτες είναι διαθέσιμες για αντισώματα έναντι άλλων νευρωνικών υποδοχέων, κυρίως έναντι των  $\alpha 7$ - και  $\alpha 4$ -nAChRs.

#### **1.2.4 Αντισώματα έναντι των $\alpha 3$ nAChRs στην Αυτοάνοση Αυτόνομη Γαγγλιονοπάθεια (Autoimmune Autonomic Ganglionopathy/ AAG)**

Οι νευρώνες στα αυτόνομα γάγγλια μεσολαβούν στον ακούσιο έλεγχο των σπλαχνικών οργάνων και εκφράζουν πολυάριθμες υπομονάδες νευρωνικών nAChRs. Οι νευρωνικοί υποδοχείς που περιλαμβάνουν την  $\alpha 3$  υπομονάδα, οι αποκαλούμενοι  $\alpha 3$ -nAChRs ή γαγγλιονικοί nAChRs, αποτελούν την πλειοψηφία των nAChRs στα αυτόνομα γάγγλια και βρίσκονται στις συνάψεις τόσο των παρασυμπαθητικών όσο και των συμπαθητικών αυτόνομων κλάδων<sup>79,80</sup>. Ωστόσο δεν εκφράζονται μόνο στην περιφέρεια αλλά εκφράζονται επίσης εστιακά σε περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζουν τον εθισμό<sup>81</sup>. Δομικά ο  $\alpha 3$ -nAChR σχηματίζεται από  $\alpha 3$  και  $\beta 4$  ή  $\beta 2$  υπομονάδες του nAChR ( $\alpha 3\beta 2$  και  $\alpha 3\beta 4$  nAChR).

Η AAG είναι μία μορφή δυσαυτονομίας, μία επίκτητη νευρολογική διαταραχή του περιφερικού συστήματος και το πιο γνωστό σύνδρομο αυτοάνοσων αυτόνομων νευροπαθειών, που χαρακτηρίζεται από διάχυτη ανεπάρκεια και δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος (ΑΝΣ)<sup>59,82,83</sup>. Τα συμπτώματα της AAG μπορούν να διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή και η έναρξη μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή σταδιακή αν και τα κλινικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν βλάβες στο συμπαθητικό (ορθοστατική υπόταση, ανιδρωσία), το παρασυμπαθητικό (μειωμένη δακρύρροια, σιελόρροια και στένωση της κόρης) και την εντερική λειτουργία (διάρροια ή δυσκοιλιότητα)<sup>59,82</sup>. Η αιτία της AAG είναι παρανεοπλασματικής ή ιδιοπαθούς φύσης. Στην ιδιοπαθή AAG, το ανοσοποιητικό σύστημα στοχεύει στους γαγγλιονικούς  $\alpha 3$ -nAChRs και παράγει συγκεκριμένα αυτοαντισώματα έναντι αυτών<sup>59,82-84</sup>. Στην AAG με παρανεοπλασματικό κλινικό υπόβαθρο, το ανοσοποιητικό σύστημα, ως απόκριση στον υποκείμενο καρκίνο, παράγει

παρανεοπλασματικά αυτοαντισώματα έναντι διάφορων αυτοαντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων των  $\alpha 3$ -nAChRs, προκαλώντας γαγγλιονοπάθεια<sup>80,84,85</sup>.

Η πρώτη περίπτωση ασθενούς με AAG, αναφέρθηκε το 1969 από τους Young *et al*<sup>86</sup>. Χρειάστηκαν σχεδόν 30 χρόνια μέχρι που οι Vernino και οι συνεργάτες του επιβεβαίωσαν την ανοσολογική αιτιολογία της νόσου και απέδειξαν την υπέρβαση αντισωμάτων έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs σε ορούς ασθενών με AAG<sup>87</sup>. Χρησιμοποιώντας την καθιερωμένη δοκιμασία ραδιοκαθίζησης, ανιχνεύονται αντισώματα κατά των  $\alpha 3$ -nAChRs στο 40-50% των ασθενών με υποξεία AAG, στο 30-40% των ασθενών με χρόνια AAG και στο 10-20% των ασθενών με παρανεοπλασματική AAG<sup>82,84,88</sup>. Ωστόσο, με αυτό τον προσδιορισμό τα αυτοαντισώματα έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs βρίσκονται επίσης σε χαμηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με άλλες δυσавтоνομίες, όπως το σύνδρομο ορθοστατικής ταχυκαρδίας, η διαβητική αυτόνομη νευροπάθεια ή η μεμονωμένη γαστρεντερική δυσκινητικότητα αλλά και σε ασθενείς με θύμωμα ή μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα-σχετικές παρανεοπλασματικές νευρολογικές διαταραχές<sup>88-91</sup>. Είναι σημαντικό ότι ο τίτλος αντισωμάτων των nAChRs στον ορό του ασθενούς σχετίζεται με την σοβαρότητα της αυτόνομης ανεπάρκειας κατά την κλινική και εργαστηριακή αξιολόγηση της αυτόνομης λειτουργίας<sup>82,84</sup>. Επιπλέον, η μείωση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων στον ορό του ασθενούς, σχετίζεται με τη βελτίωση των συμπτωμάτων της αυτόνομης δυσλειτουργίας<sup>84</sup>, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις περιπτώσεις ασθενών μετά από πλασμαφαίρεση που εξαλείφει τα αυτοαντισώματα στον ορό του ασθενούς και παρουσιάζουν εντυπωσιακή βελτίωση στις κλινικές τους εκτιμήσεις<sup>92,93</sup>.

Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα αντι- $\alpha 3$ -nAChRs αντισώματα επηρεάζουν άμεσα τους αντίστοιχους υποδοχείς, οδηγώντας έτσι σε δυσλειτουργία του αυτόνομου συστήματος. Η υπόθεση ελέγχθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και εξακολουθεί να είναι ένα ανοιχτό πεδίο για πειραματισμούς. Τα *in vitro* δεδομένα δείχνουν ότι τα αντισώματα έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs από τους ορούς ασθενών με AAG, μειώνουν το εύρος των μεμβρανικών ρευμάτων στα κύτταρα του νευροβλαστώματος<sup>94</sup>. Η κινητική αυτής της αναστολής υποδηλώνει ότι τα αυτοαντισώματα συνδέονται με τους υποδοχείς και τους διασυνδέουν, οδηγώντας τους σε εσωτερίκευση. Ωστόσο, ορισμένα αντισώματα φαίνεται ότι δρουν πιο άμεσα, αποκλείοντας την θέση του αγωνιστή στον υποδοχέα<sup>84,94</sup>. Τα *in vivo* δεδομένα υποστηρίζουν επίσης αυτή την υπόθεση με

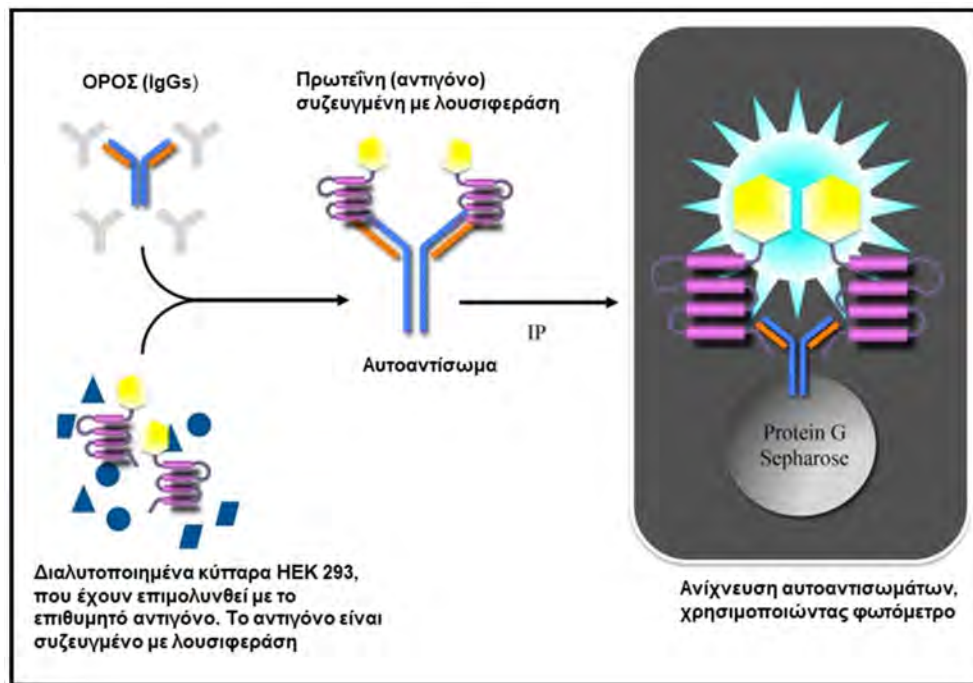
μοντέλα ποντικών της νόσου, όπου αποδεικνύεται ότι τα αντισώματα κατά των nAChRs, αναστέλλουν την χολινεργική συναπτική μετάδοση<sup>95</sup>. Τα ευρήματα από τα πειραματικά μοντέλα της AAG, βελτίωσαν σημαντικά την διάγνωση της νόσου και καθιέρωσαν έναν τρόπο για την πειραματική διερεύνηση του πιθανού παθογόνου ρόλου των γαγγλιονικών αυτοαντισωμάτων σε ζωικά μοντέλα.

### **1.2.5 Αντισώματα έναντι των α3 nAChRs στην Αυτοάνοση Εγκεφαλίτιδα (Autoimmune Encephalitis/ AE)**

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, οι α3-nAChRs, εκτός από τα αυτόνομα γάγγλια, βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό και σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, ιδιαίτερα στον μεσοσπονδύλιο πυρήνα, την επίφυση και παρουσιάζουν χαμηλότερη έκφραση στον εγκεφαλικό φλοιό, τον ιππόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα<sup>96</sup>. Επομένως, τα αντι-α3-nAChRs, θα μπορούσαν να εμπλέκονται και στην αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (AE), κατάσταση που περιλαμβάνει μία ευρεία σειρά νευρολογικών διαταραχών με βασικά συμπτώματα την επιληψία, την ψυχική και ανοϊκή συνδρομή.

Πράγματι, η δυσλειτουργία του αυτόνομου συστήματος έχει συνδεθεί με την AE και τα αυτοαντισώματα έναντι των α3-nAChRs<sup>97</sup>. Οι *Yamakawa και συν.*, εξέτασαν την παρουσία αντισωμάτων, χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης λουσιφεράσης (Luciferase Immunoprecipitation System/LIPS) (**εικόνα 6**) σε ορούς 19 ασθενών με σύνδρομο αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας (NMDAR-εγκεφαλίτιδα, σύνδρομο Stiff-person ή σύνδρομο Isaacs). 5/19 δείγματα ορών είχαν αντι-α3 αντισώματα<sup>97</sup>. Αυτοί οι 5 ασθενείς, εκτός από τα συμπτώματα της AE, είχαν αρκετά συμπτώματα αυτόνομης δυσλειτουργίας, συμπεριλαμβανομένης της ορθοστατικής υπότασης, της ανιδρωσίας ή της υπεριδρωσίας, της δυσλειτουργίας του γαστρεντερικού σωλήνα και της καρδιαγγειακής δυσλειτουργίας. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο επιπολασμός των συμπτωμάτων του καρδιαγγειακού αυτόνομου συστήματος, ήταν παρόμοιος με αυτόν στους ασθενείς με AAG<sup>97</sup>. Τα αντι-α3 αντισώματα θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν τους α3β4 nAChRs τόσο στα αυτόνομα γάγγλια όσο και στον εγκέφαλο, αλλά ο ακριβής παθογόνος μηχανισμός πρέπει να διευκρινιστεί. Ωστόσο, αναφέρεται ότι οι 5 ασθενείς με αντι-α3 αντισώματα, είχαν επίσης και άλλα αυτοαντισώματα στον ορό τους σχετιζόμενα με AE<sup>97</sup>.

Πρόσφατα, μία ομάδα στην Ιαπωνία, ανέφερε την περίπτωση μίας ασθενούς με προοδευτική εγκεφαλομυελίτιδα με ακαμψία και συμπτώματα παρόμοια με μυοκλονία και δυσαυτονομία και ήταν θετική για αντισώματα έναντι των  $\alpha 3$ - $nAChRs$ <sup>98</sup>, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα αυτοαντισώματα μπορεί να συνδέονται με ένα ευρύτερο κλινικό φάσμα από αυτό της AAG.



**Εικόνα 6. Αρχή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης λουσιφεράσης (Luciferase Immunoprecipitation System/LIPS).** Κύτταρα HEK293, επιμολυσμένα με το πλασμίδιο του  $\alpha 3$  ή  $\beta 4$   $nAChR$  που είναι συζευγμένο με λουσιφεράση, αφού διαλυτοποιηθούν, επωάζονται με τα αντισώματα ορών ασθενών. Η *in vitro* διαδικασία LIPS, μπορεί να αξιολογήσει ποσοτικά την αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος, με υψηλή ευαισθησία και χωρίς την χρήση ραδιοϊσοτόπου<sup>99</sup>.

### 1.2.6 Αυτοανοσία στους $\alpha 7$ - $nAChRs$

Ο  $\alpha 7$ - $nAChR$  εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και τα αυτόνομα γάγγλια. Εμπλέκεται σε διάφορες σύνθετες γνωστικές λειτουργίες, όπως η μάθηση, η μνήμη και η προσοχή<sup>4,100</sup>, ρυθμίζει τη συναπτική μετάδοση και παίζει ζωτικό αντιφλεγμονώδες ρόλο<sup>101</sup>. Η τρισδιάστατη δομή του έχει πρόσφατα

αποσαφηνιστεί<sup>102</sup>, γεγονός που θα πρέπει να επιταχύνει περαιτέρω την κατανόηση της λειτουργίας του και του ρόλου του στην παθογένεση της νόσου και την αυτοάνοση. Μέχρι σήμερα τα αντισώματα κατά του α7-nAChR, φαίνεται να είναι πολύ σπάνια.

### **1.2.7 Αντισώματα έναντι των α7 nAChRs στην Εγκεφαλίτιδα Rasmussen (Rasmussen Encephalitis/ RE)**

Έχει αναφερθεί ότι ο ομομερής α7-nAChR μπορεί να είναι στόχος παθογόνων αυτοαντισωμάτων στην αυτοάνοση διαταραχή της Rasmussen εγκεφαλίτιδας (RE)<sup>58</sup>. Η RE είναι μια σπάνια, προοδευτικού τύπου και ανθεκτική στα φάρμακα επιληψία, που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή του εγκεφαλικού φλοιού, γνωστική έκπτωση, κινητικά ελλείμματα, ατροφία του ημισφαιρικού εγκεφάλου και ημιπληγία. Επηρεάζει κυρίως παιδιά και νεαρούς ενήλικες με πρώιμη έναρξη της νόσου και σοβαρή πορεία ανάπτυξης<sup>103</sup>. Οι *Watson και συν.*, έλεγξαν ορούς από εννέα ασθενείς με RE με ηλεκτροφυσιολογία, με τεχνικές απεικόνισης ασβεστίου και μεθόδους προσδιορισμού δέσμευσης συνδέτη, για την παρουσία αντισωμάτων έναντι των α7-nAChRs. Δύο από τους εννέα ορούς είχαν αυτοαντισώματα κατηγορίας IgG, ειδικά για τον α7-nAChR<sup>58</sup>. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα αυτοαντισώματα αυτά στην RE, ενδέχεται να παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές λειτουργίες των α7-nAChRs, διαταράσσοντας την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών<sup>58,104</sup>. Το πεδίο έρευνας για τους α7-nAChRs στα αυτοάνοσα νοσήματα αυξάνεται και αναμένουμε περισσότερα δεδομένα για τους νευρωνικούς υποδοχείς στην RE, καθώς εντοπίσαμε σε ασθενείς με την νόσο αυτή αυτοαντισώματα και έναντι των α4-nAChR.

### **1.2.8 Αντισώματα έναντι των α7 nAChRs στην σχιζοφρένεια**

Από το 2000, εικάζεται ότι οι νευρωνικοί α7-nAChRs παίζουν ζωτικό ρόλο στην αυτοάνοση παθογένεση των ψυχικών διαταραχών και συγκεκριμένα αυτών που ανήκουν στο φάσμα της σχιζοφρένειας και των διπολικών διαταραχών<sup>105</sup>. Ο α7-nAChR, εμπλέκεται στην ακουστική σηματοδότηση στον εγκέφαλο, επομένως, η διαταραγμένη λειτουργικότητα αυτού του καναλιού θα μπορούσε

δυναμικά να οδηγήσει σε ακουστικές βλάβες, συμπεριλαμβανομένων παραισθήσεων και παρόμοια ψυχωσικά συμπτώματα που χαρακτηρίζουν την σχιζοφρένεια. Οι *Freedman και συν.*, έδειξαν μειωμένη δέσμευση της αμπουγκαροτοξίνης και καταργημένη ανοσοαντιδραστικότητα των α7 υποδοχέων στον μετωπιαίο φλοιό και στον θάλαμο σε δείγματα θανόντων σχιζοφρενών<sup>106</sup>. Οι *Chandley και συν.*, ανέφεραν αντισώματα κατά των α7-nAChRs σε ορούς ασθενών με σχιζοφρένεια<sup>104</sup>. Ο προσδιορισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν με την μέθοδο της ELISA, μέθοδος χαμηλής ειδικότητας για τα ενσωματωμένα αντιγόνα της μεμβράνης και με στατιστική ανάλυση στα όρια της σημασίας. Ωστόσο, οι *Hoffmann και συν.*, χρησιμοποίησαν την μέθοδο RIPA με σημασμένους α7-nAChRs με I<sup>125</sup>-α-μπουγκαροτοξίνη για να ελέγξουν αντισώματα σε δείγματα ορών από 368 ασθενείς με διαταραχές φάσματος σχιζοφρένειας, 140 με διπολική διαταραχή, 58 με άλλες ψυχικές διαταραχές και 118 δείγματα υγιών μαρτύρων και εντόπισαν μόνο έναν ασθενή με σχιζοφρένεια και χαμηλό τίτλο αντι-α7 αντισωμάτων<sup>105</sup>. Στην συνέχεια, εξέτασαν αρκετούς από τους ορούς με κυτταρικό ανοσοφθορισμό (CBA), συμπεριλαμβανομένου και του θετικού, με RIPA, ορού, αλλά κανένας ορός δεν βρέθηκε θετικός σε αντισώματα για τους α7-nAChRs. Ωστόσο, οι συγγραφείς παραδέχονται ότι η μέθοδος CBA που είχαν αναπτύξει ήταν χαμηλής ευαισθησίας λόγω της χαμηλής έκφρασης του α7-nAChR στις κυτταρικές μεμβράνες (κατά την έκφραση χρησιμοποίησαν μόνο την πρωτεΐνη-συνοδό RIC3)<sup>105</sup>.

Συμπερασματικά, τα αντισώματα έναντι των α7-nAChRs στην σχιζοφρένεια είναι σπάνια, ωστόσο βελτιωμένες και πιο ευαίσθητες δοκιμασίες για αυτοαντισώματα σε ασθενείς που πάσχουν από ένα ευρύ φάσμα ψυχικών διαταραχών, μπορεί να είναι σε θέση να ανιχνεύσουν περισσότερους οροθετικούς ασθενείς. Επιπλέον, σε προκαταρκτικές μελέτες των ομάδων Steiner και Tzartos, δείγματα (οροί, πλάσμα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό) από 210 ασθενείς με ψυχιατρικές διαταραχές (σχιζοφρένεια, μείζονα κατάθλιψη και διπολική διαταραχή) ελέγχθηκαν με ευαίσθητο CBA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των α3β4, α3β2, α4β2 και α7 υποδοχέων. Κανένα δείγμα δεν βρέθηκε θετικό (αδημοσίεута δεδομένα).

### 1.2.9 *In vivo* μελέτες σε ζώα για τους α7 nAChRs

Ένα ερώτημα που γεννάται είναι αν τα ειδικά αντισώματα κατά των nAChRs μπορούν να διεισδύσουν στον εγκέφαλο και έτσι να επηρεάσουν το χολινεργικό σύστημα. *In vivo* μελέτες για τους α7 και α4 nAChRs από τους Moretti και συν., έδειξαν ότι τόσο η ενδοφλέβια έγχυση ειδικών αντισωμάτων κατά του ειδικού nAChR, όσο και η ανοσοποίηση με α4 και α7, είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση των αντίστοιχων υποδοχέων σε ακατέργαστα παρασκευάσματα εγκεφάλου, με ταυτόχρονη χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για την πρόκληση φλεγμονής<sup>107</sup>. Τα ανοσοποιημένα με α7 ζώα είχαν εξασθενημένη μνήμη (αναγνώριση αντικειμένων), αν και δεν ανιχνεύθηκε καμία επίδραση στην συμπεριφορά άγχους και στην κινητική δραστηριότητα<sup>107</sup>.

Επιπλέον, οι Kalashnyk και συν., παρήγαγαν ένα ειδικό αντίσωμα κατά των α7 nAChRs (κατά των αμινοξέων 179-190 της α7 υπομονάδας), το οποίο βρέθηκε ότι διεγείρει την σηματοδότηση που εξαρτάται από την p38 κινάση, διεγείροντας την παραγωγή ιντερλευκίνης-6 (IL-6) σε κύτταρα U373 γλοιοβλαστώματος<sup>108</sup>. Φάνηκε ότι η επίδραση αυτή ήταν ανεξάρτητη από την Fc περιοχή του αντισώματος (επομένως δεν απαιτούσε διασύνδεση και εσωτερίκευση των nAChRs) αλλά οφειλόταν στην ειδικότητα του επίτοπου. Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή IL-6, ήταν πιθανώς αποτέλεσμα της δέσμησης του αντισώματος στον υποδοχέα<sup>108</sup>. Στην συνέχεια, η ίδια ομάδα ανέφερε ότι τμήματα εγκεφάλου ποντικών που ανοσοποιήθηκαν με τον α7 υποδοχέα, παρουσίασαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης GFAP (δείκτης θετικά αντιδρώντων αστροκυττάρων), και αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων των α7 και α7β2 nAChRs, σε αντίθεση με τα ζώα που δεν είχαν λάβει θεραπεία. Τα ευρήματα αυτά έδειξαν ότι συγκεκριμένα α7-αυτοαντισώματα θα μπορούσαν να διεισδύσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-Brain Barrier/ BBB) στο ανοσοποιημένο με α7 μοντέλο ποντικού, να προκαλέσουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και την ταυτόχρονη καθοδική ρύθμιση της αντιφλεγμονώδους οδού μέσω του NF-κB μονοπατιού<sup>109</sup>. Επιπλέον, τα αυτοαντισώματα κατά του α7-nAChR μπορούν να διεγείρουν συστηματική φλεγμονή και μπορούν ενδεχομένως να μειώσουν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα μέσω της εσωτερίκευσης του στον ιππόκαμπο, τον σωματοαισθητικό φλοιό και το ραβδωτό σώμα<sup>109</sup>. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες των

μηχανισμών εσωτερίκευσης και αποδόμησης που οδηγούν σε μειωμένο αριθμό υποδοχέων.

### **1.2.10 Αντισώματα έναντι των $\alpha 7$ - και $\alpha 3$ -nAChRs στην Μυασθένεια Gravis (MG)**

Ορισμένοι ασθενείς με MG, εκτός από τα ταξινομημένα συμπτώματα της νόσου, μπορεί επίσης να έχουν διαταραχές μνήμης και συμπτώματα που συνδέονται με δυσλειτουργία του ΚΝΣ και ΠΝΣ. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να προέρχονται από μία ευρεία ανοσολογική απόκριση που επιτίθεται τόσο στον μυϊκό όσο και στο νευρωνικό nAChR και για τον λόγο αυτό απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση<sup>110,111</sup>.

Οι Balestra και συν., εξέτασαν ορούς από 60 MG ασθενείς με αντισώματα κατά του μυϊκού nAChR (μαζί με ορούς ασθενών με άλλες νευρολογικές ασθένειες) για αυτοαντισώματα κατά των  $\alpha 7$ - και  $\alpha 3$ -nAChRs<sup>111</sup>. Είναι ενδιαφέρον ότι μεταξύ των ορών ασθενών με MG, βρέθηκαν πέντε θετικοί για αντι- $\alpha 7$  και δύο θετικοί για αντι- $\alpha 3$  αντισώματα<sup>111</sup>. Οι ασθενείς με αντισώματα ορού έναντι των  $\alpha 7$ - και  $\alpha 3$ -nAChRs, εμφάνισαν μια σειρά κλινικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένων των συμπτωμάτων του αυτόνομου συστήματος και του θυμώματος. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι τα πρόσθετα αυτά συμπτώματα μπορεί να συνδέονται με τα ανιχνευμένα αντισώματα ορού κατά των  $\alpha 7$ - και  $\alpha 3$ -nAChRs<sup>111</sup>. Τα ευρήματα που προέκυψαν από αυτή την μελέτη μπορεί να θεωρηθούν χρήσιμα για την αναγνώριση και τη διαφοροποίηση ορισμένων ασθενών με MG που πάσχουν από πρόσθετα αυτοάνοσα συμπτώματα του ΚΝΣ. Ωστόσο, οι διαγνωστικές διαδικασίες που στοχεύουν αποκλειστικά τα δυνητικά παθογόνα αντισώματα, μπορεί να είναι πιο σχετικές για τέτοιες μελέτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μελέτες που έγιναν από την ομάδα μας (Tzartos group), χρησιμοποιώντας τα ευαίσθητα CBA's για  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$  και  $\alpha 7$  nAChRs, ελέγχθηκαν 163 οροί μυασθενών (θετικοί σε αντισώματα κατά του μυϊκού nAChR) και κανένας δεν βρέθηκε θετικός για τους νευρωνικούς nAChRs που δοκιμάστηκαν (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Αυτό υποδηλώνει ότι τα δυνητικά παθογόνα αντισώματα έναντι των νευρωνικών nAChRs μπορεί να είναι σπάνια στην MG.

### 1.2.11 Αυτοανοσία στους $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs

Αρκετές υπομονάδες του nAChR εκφράζονται στον ιππόκαμπο, σε μέρος του μεταιχμιακού συστήματος και διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην ενδονευρική επικοινωνία. Οι νευρωνικοί nAChRs είναι υποψήφια αυτοαντιγόνα στην εγκεφαλοπάθεια και πιο συγκεκριμένα στο σύνδρομο αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας (AES), ένα φάσμα νευρολογικών ασθενειών που χαρακτηρίζεται από ταχεία έναρξη ψυχικής σύγχυσης, γνωστικές βλάβες, επιληπτικές κρίσεις και ψυχιατρικά συμπτώματα<sup>112</sup>. Τα κύρια αντιπροσωπευτικά σύνδρομα του AES περιλαμβάνουν την εγκεφαλίτιδα Rasmussen, τη μεταιχμιακή εγκεφαλίτιδα, την NMDAR-εγκεφαλίτιδα και την παρανεοπλασματική εγκεφαλίτιδα. Το 2009, οι Baker και συν., ανέφεραν ότι ένας ασθενής με AAG είχε αντισώματα ορού κατά των υπομονάδων  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ - και  $\alpha 7$ -nAChR<sup>113</sup>. Αυτή ήταν πιθανότατα η πρώτη περίπτωση που περιγράφηκε ασθενής με αυτοαντισώματα έναντι των nAChRs τόσο του ΠΝΣ όσο και του ΚΝΣ και ο ασθενής δεν εμφάνισε συμπτώματα που σχετίζονται μόνο με την AAG, αλλά ανέπτυξε επίσης εγκεφαλοπάθεια όψιμης έναρξης<sup>113</sup>.

Σε μελέτη της ομάδα μας (Tzartos group), ελέγξαμε για αντισώματα κατά του  $\alpha 4\beta 2$  nAChR με CBA, ορούς από 1752 ασθενείς «ύποπτους» για AES, 73 AES-ασθενείς, 12 ασθενείς με εγκεφαλίτιδα Rasmussen (ασθενείς από Αθήνα, Τουρκία και Μιλάνο) και 1203 ασθενείς ελέγχου με άλλες νευρολογικές ασθένειες, όπως μωσσίτιδα, σχιζοφρένεια, μείζονα κατάθλιψη, Creutzfeldt-Jacob, επιληψία και οπτική νευρομυελίτιδα από τις προαναφερθείσες χώρες και την Γερμανία. Τρεις ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για αντι- $\alpha 4\beta 2$  nAChR αντισώματα. Τα ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά των τριών ασθενών, εμπίπτουν στο φάσμα AES. Συγκεκριμένα, ένας ασθενής είχε εγκεφαλίτιδα Rasmussen, ενώ οι δύο άλλοι είχαν αυτοάνοση μηνιγγοεγκεφαλομυελίτιδα και πιθανή αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα. Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι αντισώματα έναντι του νευρωνικού  $\alpha 4\beta 2$  nAChR, μπορεί να σχετίζονται με γνωστική εξασθένηση που οφείλεται σε αυτοανοσία. Ωστόσο, τέτοιες περιπτώσεις φαίνεται να είναι σπάνιες, ενώ ο παθολογικός μηχανισμός τους δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

### **1.2.12 Αυτοανοσία στους nAChRs σε μη διεγέρσιμους ιστούς**

Οι νευρωνικοί nAChRs που εκφράζονται από μη-διεγερτά κύτταρα, εμπλέκονται στην παθογένεση της ψωρίασης<sup>56,114</sup>, των ρευματικών παθήσεων<sup>115</sup>, των φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου, του άσθματος και ορισμένων τύπων καρκίνου<sup>116</sup>. Το νευρωνικό χολινεργικό σύστημα είναι άφθονο από κερατινοκύτταρα του επιθηλίου και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της βιωσιμότητας, του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης αυτών των κυττάρων<sup>117-119</sup>. Το σύστημα λειτουργεί μέσω της ACh και των nAChRs, τόσο νικοτινικών όσο και μουσκαρινικών. Η ACh παράγεται στον ιστό του δέρματος από τα κερατινοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εισέρχονται στο δέρμα σε σημεία φλεγμονής<sup>120</sup>. Μερικές μελέτες δείχνουν την πιθανή παρουσία αντισωμάτων έναντι των νευρωνικών nAChRs στις παραπάνω ασθένειες<sup>56,114,121-123</sup>, ωστόσο ακόμα και αν υπάρχουν αντισώματα σε ορισμένους ασθενείς, η παθογόνος λειτουργία τους είναι ακόμα άγνωστη, ενώ τα διαθέσιμα δεδομένα δεν υποστηρίζουν ακόμα αυτή την ένδειξη.

## **1.3 ΦΑΣΜΑ ΟΠΤΙΚΗΣ ΝΕΥΡΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ ΚΑΙ MOGAD**

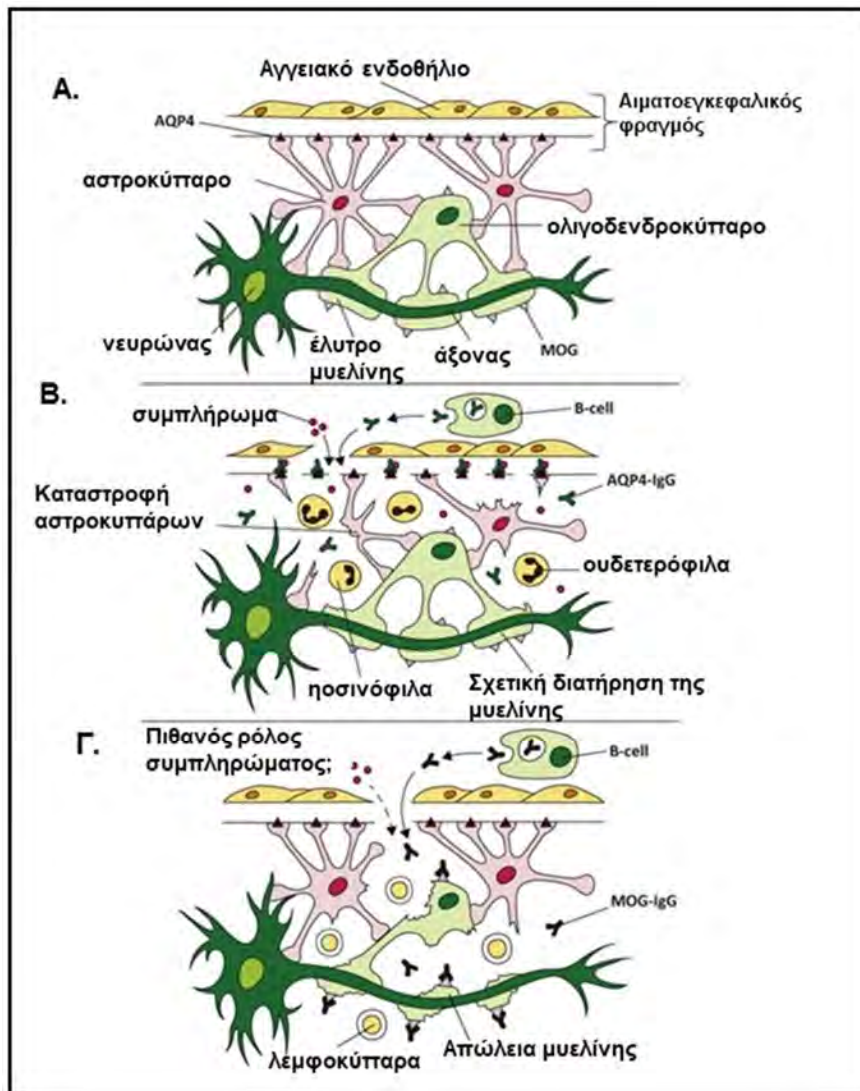
### **1.3.1 Φάσμα Οπτικής Νευρομυελίτιδας (NMOSD)**

Η διαταραχή του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας (NMOSD), είναι μία αυτοάνοση απομυελινοτική νόσος του ΚΝΣ. Ο όρος οπτική νευρομυελίτιδα περιγράφηκε το 1870 από τον Clifford Allbutt και τον Eugène Devic, το 1894. Αρχικά, θεωρήθηκε ως ένα μονοφασικό σύνδρομο που ήταν υπότυπος της σκλήρυνσης κατά πλάκας και αποτελούνταν από αμφοτερόπλευρη ταυτόχρονη οπτική νευρίτιδα και οξεία εγκάρσια μυελίτιδα. Από τότε η ανακάλυψη ενός συγκεκριμένου βιοδείκτη, το 2004<sup>124</sup>, οδήγησε σε μία νέα κατανόηση της διαταραχής αυτής. Ο βιοδείκτης αρχικά ονομάστηκε “NMO-ανοσοσφαιρίνη γ (IgG)” και ο στόχος του, το κανάλι νερού που δημιουργεί η πρωτεΐνη ακουαπορίνη-4 (aquaporin-4/ AQP4), ταυτοποιήθηκε τον επόμενο χρόνο<sup>124</sup>. Έτσι με την ανακάλυψη του αντιγονικού στόχου, οι δύο ασθένειες μπορούσαν να διακριθούν αξιόπιστα μέσω της ανίχνευσης των αντισωμάτων έναντι της AQP4 (AQP4-Abs)<sup>124</sup>. Οι τελευταίες διαγνωστικές κατευθυντήριες οδηγίες,

ενοποιεί τις μορφές που είτε σχετίζονται με αντισώματα είτε όχι, κάτω από την ομπρέλα των NMOSD<sup>125</sup>.

Από την ανακάλυψη των αντισωμάτων έναντι της AQP4, έχουν υπάρξει περισσότερες από 3000 δημοσιεύσεις σχετικά με το NMOSD. Πιο πρόσφατα ένας άλλος αντιγονικός στόχος, η γλυκοπρωτεΐνη των ολιγοδενδροκυττάρων της μυελίνης (myelin oligodendrocyte glycoprotein/ MOG), έχει εντοπιστεί σε μερικούς οροαρνητικούς στην AQP4 ασθενείς με NMOSD<sup>126</sup>.

Το κανάλι νερού της AQP4 είναι το πιο ευρέως εκφρασμένο στον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό και τα οπτικά νεύρα. Εντός του εγκεφάλου, το κανάλι βρίσκεται κυρίως σε περιοχές επαφής με το εγκεφαλονωτιαίο και εντοπίζεται ειδικά στα «πόδια» των αστροκυττάρων<sup>124</sup>. Η AQP4 υπάρχει επίσης στους συλλεκτικούς πόρους του νεφρού, στα βρεγματικά κύτταρα του στομάχου, στους αεραγωγούς, στους εκκριτικούς αδένες και στους σκελετικούς μύες<sup>127</sup>. Ωστόσο, αυτά τα όργανα σχετικά προστατεύονται από βλάβη που προκαλείται από αντισώματα, πιθανόν λόγω των τοπικών αναστολέων του συμπληρώματος που απουσιάζουν στον εγκέφαλο<sup>128</sup>. Τα αντισώματα έναντι της AQP4 είναι κυρίως IgG1 ισοτύπου. Στην AQP4-IgG οροθετική NMOSD, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της IL-6 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στον ορό, ιδίως στις υποτροπές της νόσου. Η δράση της IL-6 είναι πλειοτροπική όπως επισημαίνεται παρακάτω: α) επάγει την παραγωγή αντισωμάτων από πλασμαβλάστες<sup>129</sup>, β) ευοδώνει τη μετατροπή των T-λεμφοκυττάρων σε προφλεγμονώδη Th17 κύτταρα και γ) αυξάνει τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού<sup>130</sup>. Μόλις τα αντισώματα συνδεθούν στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα της AQP4, δημιουργείται αστροκυτταρική βλάβη που προκαλείται από κύτταρα και το συμπλήρωμα μαζί με την εσωτερίκευση του μεταφορέα του γλουταμικού EAAT-2<sup>131</sup>.



**Εικόνα 7. Απεικόνιση των θέσεων έκφρασης των πρωτεϊνών AQP4 και MOG στο ΚΝΣ. Η AQP4 εκφράζεται στα αστροκύτταρα, ενώ η MOG εκφράζεται στα ολιγοδενδροκύτταρα, στα εξωτερικά ελάσματα των περιβλημάτων μυελίνης. Β. Τα IgGs αντισώματα έναντι της AQP4, παράγονται συστηματικά από τα ώριμα Β-κύτταρα και όταν διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενεργοποιούν την βλάβη των αστροκυττάρων που προκαλείται από το συμπλήρωμα. Αρχικά, υπάρχει σχετική διατήρηση της μυελίνης. Το φλεγμονώδες περιβάλλον αποτελείται από ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα. Γ. Τα IgGs αντισώματα έναντι της MOG, παράγονται επίσης εκτός του ΚΝΣ και προκαλούν απομυελίνωση με μηχανισμούς λιγότερα γνωστούς<sup>132</sup>.**

Το αστροκύτταρο στη συνέχεια καθίσταται ανίσχυρο, καταλήγοντας τελικά στην απόσυρση της υποστήριξης των γειτονικών κυττάρων, όπως τα ολιγοδενδροκύτταρα και οι νευρώνες. Ακολουθεί διήθηση κοκκιοκυττάρων σε

συνδυασμό με την βλάβη των ολιγοδενδροκυττάρων και τελικά την απομυελίνωση<sup>133</sup>. Σε αντίθεση με την σκλήρυνση κατά πλάκας, η απομυελίνωση που παρατηρείται στο NMOSD είναι ένα δευτερογενές γεγονός και εμφανίζεται ως συνέπεια της πρωτογενούς βλάβης στα αστροκύτταρα.

Η αναφερόμενη επίπτωση και ο επιπολασμός του NMOSD, εξαρτώνται από την γεωγραφική θέση και την εθνικότητα. Οι Ασιάτες και οι αφρικανικής καταγωγής διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας να αναφέρονται στους τελευταίους<sup>134,135</sup>. Η επίπτωση και ο επιπολασμός του NMOSD κυμαίνεται από 0.05-0.40 και 0.52-4.4 ανά 100000 άτομα αντίστοιχα<sup>136</sup>. Όπως συμβαίνει με πολλά αυτοάνοσα νοσήματα, οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς σε σχέση με τους άνδρες (3:1-9:1)<sup>137</sup>. Μία γυναικεία ορμονική βάση για αυτή τη συσχέτιση μπορεί να είναι ένας παράγοντας, αλλά απαιτεί περαιτέρω μελέτη<sup>138</sup>. Η διάμεση ηλικία για την εμφάνιση της νόσου είναι τα 39 έτη, αλλά 15-20% των ασθενών μπορεί να εμφανιστούν σε παιδιά ή εφήβους (κάτω των 16 ετών) ή σε ηλικιωμένους (άνω των 65 ετών)<sup>137</sup>.

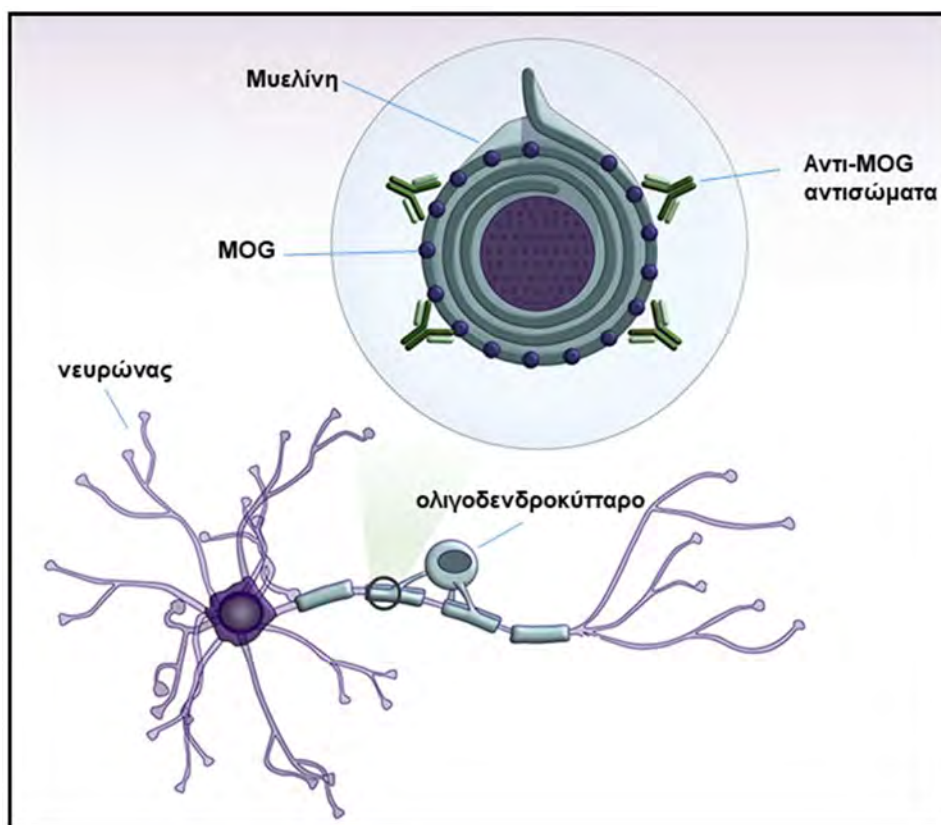
Μία πρόσφατη μελέτη αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος, εντόπισε γενετικές παραλλαγές στην κύρια περιοχή ιστοσυμβατότητας που συμβάλλουν στην αιτιολογία του NMOSD<sup>139</sup>. Περίπου ένας στους τέσσερις ασθενείς με NMOSD με αντισώματα έναντι της AQP4, έχουν άλλη μία συνυπάρχουσα αυτοάνοση νόσο, π.χ μασθένεια gravis, συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE), σύνδρομο Sjogren και κοιλιοκάκη<sup>134,140-142</sup>.

### **1.3.2 Φάσμα Οπτικής Νευρομυελίτιδας (NMOSD) – Νόσος με αντισώματα έναντι της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOGAD)**

Το 2012, ορισμένοι ασθενείς με NMOSD, οροαρνητικοί για αντι-AQP4 αντισώματα, βρέθηκε να έχουν αντισώματα έναντι της MOG (MOG-Abs). Η MOG είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια των ολιγοδενδροκυττάρων και της μυελίνης στο ΚΝΣ<sup>143,144</sup> (**εικόνα 8**). Αν και ο ακριβής ρόλος της παραμένει ασαφής, θεωρείται ότι δρα ως κυτταρικό συγκολλητικό μόριο, ότι εμπλέκεται ως ρυθμιστής της σταθερότητας των

μικροσωληνίσκων των ολιγοδενδροκυττάρων και ως μεσολαβητής στον καταρράκτη του συμπληρώματος<sup>145</sup>.

Τα αντι-MOG αντισώματα έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία 30 χρόνια, με ορισμένες πρώιμες πειραματικές μελέτες να υποθέτουν έναν παθογόνο ρόλο στις φλεγμονώδεις νόσους του ΚΝΣ<sup>146,147</sup>. Αυτή η υπόθεση υποστηρίχθηκε αργότερα από την ανακάλυψη των αντισωμάτων σε ορούς και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως ELISA και Western blot<sup>148-150</sup>.



**Εικόνα 8. Απεικόνιση των θέσεων έκφρασης της πρωτεΐνης MOG στο ΚΝΣ.** Απεικόνιση των θέσεων έκφρασης της πρωτεΐνης MOG, στο ΚΝΣ. Η γλυκοπρωτεΐνη MOG, βρίσκεται στην κορυφή του εξωτερικού στρώματος της μυελίνης<sup>151</sup>.

Ωστόσο, η πρόσφατη ανάπτυξη εξαιρετικά ευαίσθητων και ειδικών μεθόδων για την ανίχνευση ειδικών MOG αντισωμάτων με την χρήση του κυτταρικού ανοσοφθορισμού (CBA), μαζί με την διαγνωστική ταξινόμηση παρόμοιων νευροφλεγμονωδών καταστάσεων, κατέστησε δυνατό τον

εντοπισμό μιας υποομάδας ασθενών με MOG-αντισώματα που εκφράζουν έναν κλινικό φαινότυπο διαφορετικό από αυτό των ασθενών με ΣΚΠ ή οπτική νευρομυελίτιδα (NMO)<sup>125,152-154</sup>. Επομένως η νόσος MOGAD, αναγνωρίζεται πλέον ως ξεχωριστή νοσολογική οντότητα με συγκεκριμένες διαχειριστικές και θεραπευτικές απαιτήσεις.

### **1.3.3 Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου των MOG αντισωμάτων (MOGAD)**

Η νόσος MOGAD είναι μια φλεγμονώδης απομυελινωτική κατάσταση του ΚΝΣ που χαρακτηρίζεται από μονοφασική ή υποτροπιάζουσα νευρολογική δυσλειτουργία, η οποία δεν ανταποκρίνεται στα τυπικά κριτήρια της ΣΚΠ ή άλλης γνωστής νευροφλεγμονώδους πάθησης και εμφανίζεται παρουσία MOG αντισωμάτων στον ορό, τα οποία ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας ειδικές κυτταρικές αναλύσεις<sup>155</sup>. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις, η απομυελίνωση που σχετίζεται με τα MOG αντισώματα, εμφανίζεται χωρίς καμία προφανή υποκίνηση ή προδιαθεσικό συμβάν/ασθένεια, έχει συσχετιστεί με την απομυελινωτική NMDAR εγκεφαλίτιδα, την μεταλοιμώδη απομυελίνωση μετά από τον απλό ιό του έρπητα, λοιμώξεις από τους ιούς *Borrelia* και *Epstein-Barr* και πιο σπάνια με τυπική υποτροπιάζουσα ΣΚΠ<sup>156-159</sup>.

Η MOGAD μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις δεκαετίες της ζωής. Επικρατεί κυρίως στις γυναίκες και με μέση ηλικία έναρξης τα 30-35 έτη<sup>156,157</sup>. Το πιο κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η οπτική νευρίτιδα, που εμφανίζεται σε ποσοστό 54-61% των ασθενών, ακολουθούμενη από μυελίτιδα, οξεία διάχυτη εγκεφαλομυελίτιδα (ADEM) ή παρόμοια με την ADEM κατάσταση (π.χ επίθεση εγκεφαλικού στελέχους)<sup>157,160,161</sup>. Υποτροπιάζουσα πορεία έχει αναφερθεί στο 44-83% των ασθενών<sup>157</sup> και κυρίως επηρεάζει το οπτικό νεύρο<sup>160,161</sup>. Η MOG-θετική οπτική νευρίτιδα είναι συχνά αμφοτερόπλευρη και σχετίζεται με οίδημα της κεφαλής του οπτικού νεύρου<sup>162</sup>. Ο αντίκτυπος των υποτροπών στην αναπηρία είναι ποικίλος: ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ μονοφασικών και υποτροπιάζουσων παθήσεων<sup>163</sup>, ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν επιδείνωση στην αναπηρία που σχετίζεται με υψηλότερη συχνότητα υποτροπής<sup>164</sup>. Πιστεύεται ότι οι MOG θετικοί ασθενείς, έχουν χαμηλότερο κίνδυνο υποτροπών από τους AQP4 θετικούς ασθενείς<sup>163</sup>, καθώς και ότι έχουν καλύτερη οπτική και κινητική κατάσταση<sup>163,164</sup>.

### 1.3.4 Ανίχνευση των MOG αντισωμάτων στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)

Είναι γνωστό ότι η ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών γ (IgGs) έναντι της MOG, ανιχνεύεται στον ορό και το ENY με την τεχνική του κυτταρικού ανοσοφθορισμού και χρησιμοποιώντας ολόκληρη την αλληλουχία της ανθρώπινης MOG πρωτεΐνης ως αντιγόνο-στόχος<sup>152,153</sup>. Για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, ο έλεγχος των MOG αντισωμάτων θα πρέπει να περιοριστεί μόνο σε επιλεγμένες περιπτώσεις, σύμφωνα με τις οποίες τα κλινικά και παρακλινικά χαρακτηριστικά θα ταιριάζουν με την νόσο MOGAD<sup>155</sup>.

Έχει βρεθεί ότι οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι υψηλότεροι κατά την φάση της υποτροπής παρά κατά την ύφεση<sup>163</sup>. Ένας φθίνων τίτλος υπάρχει συνήθως στην μονοφασική πορεία της νόσου και η εξάλειψη των αντισωμάτων (αρνητικός τίτλος) εμφανίζεται μεταξύ 8-36 μηνών από ένα οξύ συμβάν, χωρίς περαιτέρω υποτροπές<sup>157,164</sup>. Ωστόσο, ακολουθώντας αρνητικό αποτέλεσμα, τα αντισώματα μπορούν να γίνουν ξανά θετικά μετά από λίγα χρόνια<sup>164</sup>. Στα παιδιά ο συνεχής υψηλός τίτλος αντισωμάτων (π.χ άνω των 24 μηνών), σχετίζεται με κίνδυνο υποτροπής<sup>159</sup>.

Δεν υπάρχει σαφής ομοφωνία σχετικά με την παρακολούθηση των αντισωμάτων. Ωστόσο, καθώς τα αντισώματα μπορεί να αυξηθούν στην υποτροπή και στην συνέχεια να γίνουν αρνητικά, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι χρειάζεται τακτική παρακολούθηση κατά την διάγνωση καθώς και σε όλη την διάρκεια της νόσου. Μερικοί προτείνουν ότι ένα μεσοδιάστημα επανεξέτασης 6-12 μηνών μπορεί να είναι χρήσιμο<sup>155</sup>.

## **2 ΣΚΟΠΟΣ**

## 2. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι τα αντισώματα έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs, μπορεί να έχουν παθογόνες ιδιότητες με αποτέλεσμα την αλλοίωση της συναπτικής μετάδοσης στο συμπαθητικό, στο παρασυμπαθητικό και στα εντερικά γάγγλια. Τέτοια αντισώματα έχουν βρεθεί σε ασθενείς με AAG που χαρακτηρίζονται με αυτόνομη ανεπάρκεια με κύρια κλινικά χαρακτηριστικά τα εξής: ορθοστατική υπόταση, ξηροστομία, κατακράτηση ούρων, ανιδρωσία και γαστρεντερική δυσκινητικότητα.

Ωστόσο, χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι των  $\alpha 3$ -nAChRs, έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα νευρολογικά νοσήματα με άγνωστες κλινικές και θεραπευτικές επιπτώσεις. Η καθιερωμένη διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αντισωμάτων αυτών, είναι η δοκιμασία ραδιοανοσοκαθίζησης, όπου χρησιμοποιείται σημασμένος υποδοχέας  $\alpha 3$ -nAChR με  $^{125}$ -επιβατιδίνη. Αν και η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την διάγνωση της AAG, χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων έχουν χαμηλή ειδικότητα για την AAG (~50%) και συχνά ανιχνεύονται στο σύνδρομο ορθοστατικής ταχυκαρδίας (POTS) ή σε άλλα νευρολογικά σύνδρομα όπου ο ρόλος των αντισωμάτων αυτών δεν έχει αιτιολογηθεί. Επομένως, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη μίας δοκιμασίας με την οποία θα ανιχνεύονται ειδικά μόνο τα δυνητικά παθογόνα για την νόσο αυτή, αντισώματα έναντι του  $\alpha 3$ -nAChR και με υψηλή ευαισθησία. Το CBA θεωρείται η ιδανική μέθοδος για την ανίχνευση των δυνητικά παθογόνων αντισωμάτων κατά των νευρωνικών και νευρογλοιακών αντιγόνων, συνήθως με υψηλή ειδικότητα.

Η έκφραση των νευρωνικών nAChRs από επιμολυσμένα κύτταρα είναι συνήθως χαμηλή, απαγορεύοντας την απαιτούμενη υψηλή ευαισθησία των αντίστοιχων μεθοδών κυτταρικού ανοσοφθορισμού. Στην παρούσα διατριβή, ο κύριος στόχος ήταν η βελτιστοποίηση της έκφρασης του  $\alpha 3$ -nAChR και επομένως η ανάπτυξη μεθόδου CBA με υψηλή ευαισθησία. Η συνέκφραση των nAChRs με τις πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς RIC3 και NACHO, αλλά και η προσθήκη νικοτίνης στα επιμολυσμένα κύτταρα οδήγησε στον στόχο αυτό. Η ανάπτυξη του CBA αυτού και η ανίχνευση αντισωμάτων μόνο έναντι των εκτεθειμένων στην επιφάνεια των κυττάρων επιτόπων, οδηγεί στην ανίχνευση των δυνητικά παθογόνων για την AAG αντισωμάτων. Με την μελέτη αυτή

στοχεύαμε να ξεπεράσουμε την χαμηλή ειδικότητα της νόσου με τις υπάρχουσες δοκιμασίες ανίχνευσης αντισωμάτων.

Ακόμα, αντισώματα έναντι των  $\alpha 4$ -nAChRs είναι υποψήφια αυτοαντιγόνα στο σύνδρομο αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας (AES), ένα φάσμα νευρολογικών ασθενειών που χαρακτηρίζεται από ταχεία έναρξη ψυχικής σύγχυσης, γνωστικές βλάβες, επιληπτικές κρίσεις και ψυχιατρικά συμπτώματα. Το AES περιλαμβάνει μια ομάδα διαταραχών στις οποίες το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή επιτίθεται σε αυτοαντιγόνα που εκφράζονται στο ΚΝΣ. Αντισώματα σε αρκετούς μεμβρανικούς υποδοχείς, όπως ο NMDAR, έχουν εντοπιστεί στο AES, αλλά πολλοί ασθενείς δεν έχουν αναγνωρισμένα αυτοαντισώματα. Βασιζόμενοι στο  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR CBA, βελτιώσαμε την μέθοδο ανίχνευσης των δυνητικά παθογόνων αντισωμάτων του  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, για την ταυτοποίηση αυτοαντισωμάτων σε «ορφανές» περιπτώσεις AES. Ελέγξαμε 1752 ορούς ασθενών από την Ελλάδα, την Τουρκία και την Ιταλία που ζήτησαν έλεγχο για AES και 1203 ορούς ασθενών «ελέγχου» με άλλες νευροψυχιατρικές ασθένειες. 3 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για αντισώματα έναντι του  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. Τα ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά των 3 θετικών ασθενών συμπίπτουν με το φάσμα του AES.

Σχετικά με το δεύτερο μέρος της διατριβής αυτής και το ενδιαφέρον μας για την μελέτη ασθενών που ανήκουν στο φάσμα της οπτικής νευρομυελίτιδας και συγκεκριμένα στη νόσο με αντισώματα έναντι της γλυκορωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOGAD), είναι γνωστό ότι έχουν ανιχνευθεί IgG αντισώματα, ειδικά για την φυσική μορφή της MOG πρωτεΐνης σε ένα ευρύ φάσμα απομυελινωτικών διαταραχών του ΚΝΣ, με σημαντική κλινική επίπτωση. Στις διαταραχές αυτές ανήκουν η οξεία διάχυτη εγκεφαλομυελίτιδα (ADEM), η οπτική νευρομυελίτιδα (NMO), η οπτική νευρίτιδα (ON), η μυελίτιδα, η εγκεφαλίτιδα εγκεφαλικού στελέχους, η άτυπη σκλήρυνση κατά πλάκας και πρόσφατα η αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι IgG αντισώματα έναντι της MOG, μπορεί να έχουν παθογόνες ιδιότητες με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος ή την ενεργοποίηση των naïve T κυττάρων. Σε ζωικά μοντέλα, τα αντι-MOG αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν απομυελίνωση του ΚΝΣ μέσω παθογόνων αποκρίσεων και των T- και B-κυττάρων.

Ωστόσο, τα αντισώματα για την μη-εγγενή μορφή της MOG, χρησιμοποιώντας την μέθοδο ELISA, ή αντι-MOG λιγότερο ειδικά όπως αυτά της τάξης των IgM, μπορεί να μην παίζουν κλινικό ρόλο για την συγκεκριμένη νόσο καθώς μπορεί να ανιχνευθούν τόσο σε ασθενείς με άλλη νόσο όσο και σε υγιείς εξεταζόμενους. Για να αποφευχθούν ψευδώς θετικές περιπτώσεις στο φάσμα της MOGAD, σε αρκετές μελέτες συμπεριελάμβαναν ασθενείς με υψηλούς τίτλους ολικών αντι-MOG αντισωμάτων, ενώ σε άλλες μελέτες συμπεριελάμβαναν περιπτώσεις θετικών IgG1 ασθενών, ακόμα και με χαμηλούς τίτλους. Παρά το γεγονός ότι σε αρκετές μελέτες, έχουν δοθεί πληροφορίες για το κλινικό και ακτινολογικό φάσμα των απομυελινωτικών αντι-MOG ασθενειών, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα που θα καθορίζει τα όρια του φάσματος της MOGAD. Επιπλέον, υπάρχει ακόμα ανεπαρκής γνώση προκειμένου να καθοριστεί η καλύτερη μέθοδος για την ανίχνευση των MOG αντισωμάτων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το CBA είναι μακράν η δοκιμασία προτίμησης για την ταυτοποίηση των επιτόπων που εξαρτώνται από την διαμόρφωση. Υπάρχουν όμως ακόμη κρίσιμες διαφορές μεταξύ των παραλλαγών CBA που χρησιμοποιούνται από διάφορες ομάδες.

Στην παρούσα μελέτη, επιδιώξαμε να διερευνήσουμε το κλινικό και ακτινολογικό φάσμα 21 ασθενών θετικών για IgG1 αντι-MOG, που εντοπίστηκαν σε μία ελληνική ομάδα 426 ασθενών, οι οποίοι ήταν «ύποπτοι» για MOGAD. Επιπλέον, συγκρίναμε τα τρία πιο κοινά χρησιμοποιούμενα CBA για την ανίχνευση των αντι-MOG, χρησιμοποιώντας τους ορούς από τους 21 θετικούς IgG1 αντι-MOG ασθενείς καθώς και τους ορούς από τους υπόλοιπους 405 ασθενείς που ήταν αρνητικοί για IgG1 αντισώματα.

### **3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 3.1 ΥΛΙΚΑ

### 3.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές και τα όργανα που αναφέρονται παρακάτω:

- Επωαστήρας για καλλιέργειες βακτηρίων υπό ανάδευση (Biosan)
- Επωαστήρας για καλλιέργειες βακτηρίων, στατικός (Thermo Scientific)
- Φασμαφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους UV-2005 (P-Selecta)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Eppendorf και πλαστικοί σωλήνες κατάλληλοι για φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές (Eppendorf 5810R)
- Μικροφυγόκεντρος (Fast Gene)
- Θερμαινόμενος αναδευτήρας (Thermo Block/ Biosan TS-100C)
- Υδατόλουτρο (WISE BATH, Wisd)
- Θάλαμος νηματικής ροής (TELSTAR)
- Ζυγός (KERN PCB)
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας για την μέτρηση μικρών ποσοτήτων (KERN)
- Μετρητής pH (HANNA HI2212)
- Επωαστικός κλίβανος 5% CO<sub>2</sub> και 37°C (MEMMERT ICO105med)
- Μικροσκόπιο φθορισμού/ορατού (Olympus CKX41)
- Πιπέτες 20μl, 200μl και 1000μl (Orange Scientific)
- Επαναληπτική πιπέτα (Brand)
- Αναδευτήρας οριζόντιας κίνησης (WISE STIR, Witeg SHO-1D)
- Αναδευτήρας vortex (Witeg VM-10)
- Θερμαινόμενος αναδευτήρας (Wise Stir, Wisd MSH-20A)
- Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (WISE VEN, Wisd)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (WISE CLAVE, Wisd)
- γ-μετρητής (LB 2111 multi crystal gamma counter/ Berthold Technologies)

### 3.1.2 Αναλώσιμα

- Τρυβλία petri για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων (GreinerBio-One)
- Κωνικές φιάλες 500ml και 1L (Isolab)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου μίας χρήσης 15ml και 50ml (Sarsted)
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) και πλαστικές αποστειρωμένες πιπέτες 5ml και 10ml (Sarsted)
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) για επαναληπτική πιπέτα (Brand)
- Γυάλινες σύριγγες (ROTH)
- Κυψελίδα χαλαζία για μέτρηση οπτικής απορρόφησης διαλύματος στην περιοχή του υπεριώδους
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,22μm (profilter Millipore)
- 100mm πιάτα καλλιέργειας (Corning)
- 96-well πλάκες για HEK293 (Corning Costar)
- Πλαστικά φυαλίδια με καπάκι για την κρυοσυντήρηση των κυτταρικών σειρών (Greiner Bio-One)

### 3.1.3 Αντιδραστήρια

- Bacto-tryptone, Bacto-peptone, Bacto yeast extract και Bacto agar (Difco Laboratories)
- Αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA, Applichem)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- 10% Fetal Bovine Serum / FBS (gibco)
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0.25% (Invitrogen)
- Διάλυμα περιέχων πενικιλίνη 10000unit/ml και 10000μg/ml (Pen/Strep, Invitrogen)
- Αμπικικιλίνη (Bristol Mayer Squib)
- Καναμυκίνη (Bristol Mayer Squib)
- Απιονισμένο νερό (Water for Injection)
- HEPES (PanReac / Applichem)
- Triton X-100 (Sigma)
- Διάλυμα φορμαλίνης 10% (PFA, Sigma)

- Πολυ-L-λυσίνη (Sigma)
- Μεθανόλη Ultrapure (PanReac / Applichem)
- Αιθανόλη Ultrapure (PanReac / Applichem)
- 2-propanol (PanReac / Applichem)
- διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO/Sigma)
- Hoechst 33258 για χρώση των πυρήνων (40044 Biotium)
- Biocidal, διάλυμα καθαρισμού επιφανειών στον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών (ChemBiotin)
- Νικοτίνη (Sigma)
- DL-α-Difluoromethylornithine hydrochloride hydrate/ DFMO (Sigma)
- Eribatidine [125I] (BIOTREND)

### 3.1.4 Προσσκευασμένα αντιδραστήρια

- Jet Prime reagent kit (Polyplus)
- NucleoBond Xtra Midi kit από Macherey Nagel

### 3.1.5 Αντισώματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα:

#### i) Μονοκλωνικά αντισώματα

Μονοκλωνικά αντισώματα 299 (ειδικό για την α4 υπομονάδα) και 295 (ειδικό για την β2 υπομονάδα) (φιλική δωρεά από τον καθηγητή Jon Lindstrom)

#### ii) Πολυκλωνικά αντισώματα

- Alexa Fluor 488 mouse anti-human IgG1 (Invitrogen)
- Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Invitrogen)
- Rabbit anti-human IgG (H+L), unconjugated (Invitrogen)
- Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen)
- Goat anti-human IgG (Fc-specific)-Cy3 conjugated (C2571/ Sigma)
- Mouse anti-human IgG2, secondary antibody, unconjugated (Invitrogen)
- Mouse anti-human IgG3, Hinge secondary antibody unconjugated (Invitrogen)

- Mouse anti-human IgG4, secondary antibody, unconjugated (Invitrogen)
- Alexa Fluor 488 anti-human IgM, secondary antibody (Invitrogen)
- α-μπουγκαροτοξίνη, Alexa Fluor 488 conjugate (Life Technologies)
- Goat anti-human IgG (H+L) (RSR Ltd, Cardiff; αριθμός προϊόντος RBA/Ig100)

### 3.1.6 Κυτταρικές Σειρές

- HEK 293 (ATCC)
- Βακτηριακά στελέχη TOP10F' του γένους Escherichia Coli (Thermo Scientific)

**Πίνακας 1.** Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας και ρυθμιστικά διαλύματα

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας και Ρυθμιστικά διαλύματα	Συστατικά
Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυτάρων θηλαστικών	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1x ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</li> <li>• 10% Fetal Bovine Serum (εμβρυικός ορός βοδιού), περιέχει ιχνοστοιχεία, αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες.</li> <li>• 0.375% όξινο ανθρακικό νάτριο, ( pH 7.2)</li> <li>• 2mM L-γλουταμίνη, απαραίτητο αμινοξύ για την σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.</li> <li>• 100units/mL πενικιλίνη</li> <li>• 100μg/mL στρεπτομυκίνη, για αναστολή Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων αντίστοιχα.</li> </ul>
Υγρά μέσα καλλιέργειας βακτηριακών κυτάρων (1L)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5g NaCl</li> <li>• 10g tryptone</li> <li>• 5g εκχύλισμα ζύμης</li> </ul>
Στερεό θρεπτικό υλικό LB (1L)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5g NaCl,</li> <li>• 10g tryptone,</li> <li>• 5g εκχύλισμα ζύμης</li> <li>• 15g άγαρ</li> <li>• Προσθήκη αντιβιοτικού (αμπικιλίνη, καναμυκίνη)</li> <li>• Επιστρώνονται σε ασηπτικές συνθήκες τρυβλία</li> <li>• Τα τρυβλία διατηρούνται στους 4°C για 1 μήνα το μέγιστο</li> </ul>
Κρυοπροστατευτικό διάλυμα φύλαξης κυτάρων βαθιάς κατάψυξης (Freezing medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20% θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας</li> <li>• 70% FBS</li> <li>• 10% διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)</li> </ul>
Διάλυμα πλύσεων σε live CBA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1x ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</li> <li>• 10% Fetal Bovine Serum (εμβρυικός ορός βοδιού)</li> <li>• 1% Penicillin/Streptomycin</li> <li>• 0.46%w/v HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)</li> </ul>
PBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB), 137mM (0.8% w/v) NaCl, 2.7mM (0.02% w/v) KCl , pH 7,4</li> </ul>
Διάλυμα πλύσεων ραδιενέργειας	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PBS, 0.05% Triton X-100, pH 7,5</li> </ul>

## **3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.2.1 Μέθοδοι κυτταρικής Βιολογίας**

#### **3.2.1.1 Κυτταροκαλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων-Υγρές καλλιέργειες**

Τα βακτηριακά στελέχη TOP10F' του γένους *Escherichia Coli* καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο Lysogeny Broth (LB) (**πίνακας 1**). Με δεδομένο ότι το μετασχηματισμένο πλασμίδιο που περιέχουν τα συγκεκριμένα βακτήρια έχει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη, καναμυκίνη κ.α.), στο θρεπτικό υλικό προστίθεται και το συγκεκριμένο αντιβιοτικό ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη βακτηρίων που δεν φέρουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Οι βακτηριακοί κλώνοι διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε διάλυμα LB και γλυκερόλης.

#### **3.2.1.2 Παρασκευή αποθέματος βακτηριακών κυττάρων**

Για την μακρόχρονη διατήρηση πλασμιδιακού DNA που έχει αναπτυχθεί σε υγρή καλλιέργεια προστίθεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο Eppendorf σε στείρες συνθήκες 500μl υγρής καλλιέργειας και 500 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης και έπειτα από καλή ανάδευση αποθηκεύεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.1.3 Στερεές καλλιέργειες**

Οι στερεές βακτηριακές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε τρυβλία διαμέτρου 100mm, τα οποία είναι επιστρωμένα με αποστειρωμένο LB και άγαρ (**πίνακας 1**), έναν πολυσακχαρίτη που στερεοποιείται σε θερμοκρασία μικρότερη από  $40^{\circ}\text{C}$ . Το άγαρ διαλύεται κατά την υγρή αποστείρωση και στο διάλυμα LB άγαρ προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό πριν την επίστρωση των τρυβλίων.

Το βακτηριακό στέλεχος που έχει χρησιμοποιηθεί για τις παρούσες μελέτες είναι το TOP10F' του γένους *Escherichia coli* (*E.coli*). Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων οι βακτηριακές υγρές καλλιέργειες επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση και καλό αερισμό για 12-16 ώρες, ενώ τα βακτηριακά κύτταρα των στερεών καλλιέργειών επωάζονται στα τρυβλία στις ίδιες συνθήκες.

### **3.2.1.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς**

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται προκειμένου να εισαχθεί στο βακτηριακό DNA ένα νέο πλασμίδιο. Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικά βήματα θερμικού σοκ. Στα βακτηριακά κύτταρα προστίθεται το υπο μελέτη DNA που χρειάζεται να εκφραστεί. Τα κύτταρα επωάζονται με το συγκεκριμένο DNA στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 42°C για 90'' και ακολούθως επανατοποθετούνται στον πάγο για 2 λεπτά. Αμέσως μετά τοποθετούνται σε 1ml διαλύματος LB και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντίστοιχο αντιβιοτικό και επωάζονται στους 37°C για 12-16 ώρες.

### **3.2.1.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια**

Οι μοναδιαίες αναπτυγμένες βακτηριακές αποικίες που προέκυψαν μετά από μετασχηματισμό βακτηρίων απομακρύνονται από το τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικά και συλλέγονται σε υγρό θρεπτικό υλικό (LB) με τη βοήθεια αποστειρωμένου ακρορύγχιου (tip). Αυτές οι βακτηριακές αποικίες περιέχουν το DNA της επιλογής μας. Στη συνέχεια τοποθετούνται στους 37°C υπο ανάδευση για 12-16 ώρες και την επόμενη μέρα το υγρό θρεπτικό υλικό όπου έχουν αναπτυχθεί τα βακτήρια συλλέγεται και χρησιμοποιείται για την απομόνωση του DNA με τη χρήση του Midiprep kit της εταιρίας Macherey and Nagel ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.1.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA**

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται φασματομετρικά με μετρήσεις στα 260nm (απορρόφηση των νοουκλεϊκών οξέων) και στα 280nm (απορρόφηση για πρωτεΐνες). Ο λόγος της οπτικής απορρόφησης στα 260nm/280nm δηλώνει την καθαρότητα του δείγματος. Οι τιμές των δειγμάτων με πλασμιδιακό DNA που πλησιάζουν στο 1,8 δηλώνουν πως το δείγμα είναι καθαρό και απαλλαγμένο από πρωτεΐνες ενώ για το RNA οι τιμές του λόγου 260/280 που δείχνουν την καθαρότητα του δείγματος θα πρέπει να βρίσκονται κοντά στο 2.

## 3.2.2 Καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών

### 3.2.2.1 Κυτταρική σειρά HEK293

Η κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε από τους ερευνητές Alex Van der Eb και Frank Graham στις αρχές του 1970 στο Πανεπιστήμιο Leiden της Ολλανδίας και το όνομα HEK293 δόθηκε καθώς αυτό ήταν το 293<sup>ο</sup> πείραμα του Graham (<https://www.hek293.com>). Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο DMEM (**πίνακας 1**). Τα HEK293 είναι ένα πολύ δημοφιλές κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιείται σε μελέτες πολλαπλασιασμού και σε πειράματα διαμόλυνσης καθώς επιδεικνύει μεγάλη ευκολία στην ενσωμάτωση ξένου DNA. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού (υγιούς ανθρώπινου εμβρύου μετά από αποβολή) που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια. Η κυτταρική σειρά HEK293 δημιουργήθηκε αρχικά μετά από μετασχηματισμό και καλλιέργεια των κυττάρων HEK293 μαζί με DNA του αδενοϊού 5. Ο μετασχηματισμός αυτός είχε ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση 4.5 kB του ιϊκού DNA στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 19 των HEK293 κυττάρων.

### 3.2.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας HEK293

Τα κύτταρα HEK293 καλλιεργούνται σε στείρες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής τύπου laminar air flow και με αποστειρωμένα μέσα όπως πιπέτες, δοχεία και αποστειρωμένα υλικά (θρεπτικό, θρυψίνη, PBS, water for injection). Τα κύτταρα τοποθετούνται σε θρεπτικό υλικό (**πίνακας 1**) μέσα σε αποστειρωμένα τρυβλία διάφορων μεγεθών (100, 35 ή 22mm) και επωάζονται σε επωαστικούς θαλάμους σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) και ατμόσφαιρας διοξειδίου του άνθρακα (5%).

Με το πέρας των ημερών τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται οπότε και αυξάνουν σε αριθμό και εφόσον είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια του τριβλίου καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο μέρος. Όταν καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας πρέπει να ανακαλλιεργηθούν προκειμένου να διατηρηθούν ζωντανά και να αφαιρεθούν τα προϊόντα του μεταβολισμού τους (εμφανής αλλαγή χρώματος του θρεπτικού λόγω αλλαγής του pH). Οπότε αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα στη φλάσκα ξεπλένονται με 2mL αποστειρωμένου PBS ή φρέσκου θρεπτικού υλικού και προστίθεται 2ml

θρυψίνης (για τρυβλίο 100mm) και τα κύτταρα αφήνονται με τη θρυψίνη στους 37°C στον κλίβανο επώασης για 2 λεπτά ή για περίπου 5 λεπτά στον θάλαμο (hood). Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύονται με θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται εκ νέου σε τρυβλία.

### **3.2.2.3 Κρυο-διατήρηση και απόψυξη κυττάρων από βαθιά κατάψυξη/υγρό άζωτο**

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο υγρό άζωτο (-196°C). Μετά τη θρυψινοποίηση τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα DMEM, εμβρυικού βόειου ορού (FBS) και διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO) (*πίνακας 1*) καθώς το DMSO προλαμβάνει την καταστροφή των κυττάρων από την κρυστάλλωση του ύδατος. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε αποστειρωμένες κρυοπροστατευτικές αμπούλες και αποθηκεύονται στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες οπότε και μεταφέρονται στο υγρό άζωτο. Τα παγωμένα κύτταρα τοποθετούνται κατευθείαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C. Όταν ξεπαγώσει το κυτταρικό εναιώρημα, μεταφέρεται σε falcon που περιέχει 10mL πλήρους θρεπτικού υλικού και κατόπιν πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5' στις 1200rpm, ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο, που περιέχει το τοξικό παράγοντα DMSO, απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε νέο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε φλάσκα ή τρυβλίο και τοποθετούνται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και σταθερής παροχής 5%CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2.4 Προετοιμασία κυττάρων για διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τις πρωτεΐνες-στόχους με την μέθοδο της πολυαιθυλενιμίνης**

Τα κύτταρα HEK293 διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, που περιέχει 10% εμβρυικό βόειο ορό (fetal bovine serum/FBS) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη στους 37 °C και σε 5%CO<sub>2</sub>. Ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA μπορεί υπό κατάλληλες συνθήκες να εισαχθεί στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων και να εκφρασθεί. Αυτή η δυνατότητα επιτρέπει τη μελέτη της λειτουργίας και της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων. Η έκφραση του πλασμιδιακού DNA μπορεί να είναι μόνιμη (stable) εφόσον το ξένο DNA

ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα ή παροδική (transient) εφόσον δεν ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα και αποδομείται μετά την παρέλευση ενός μιτωτικού κύκλου. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε παροδική έκφραση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

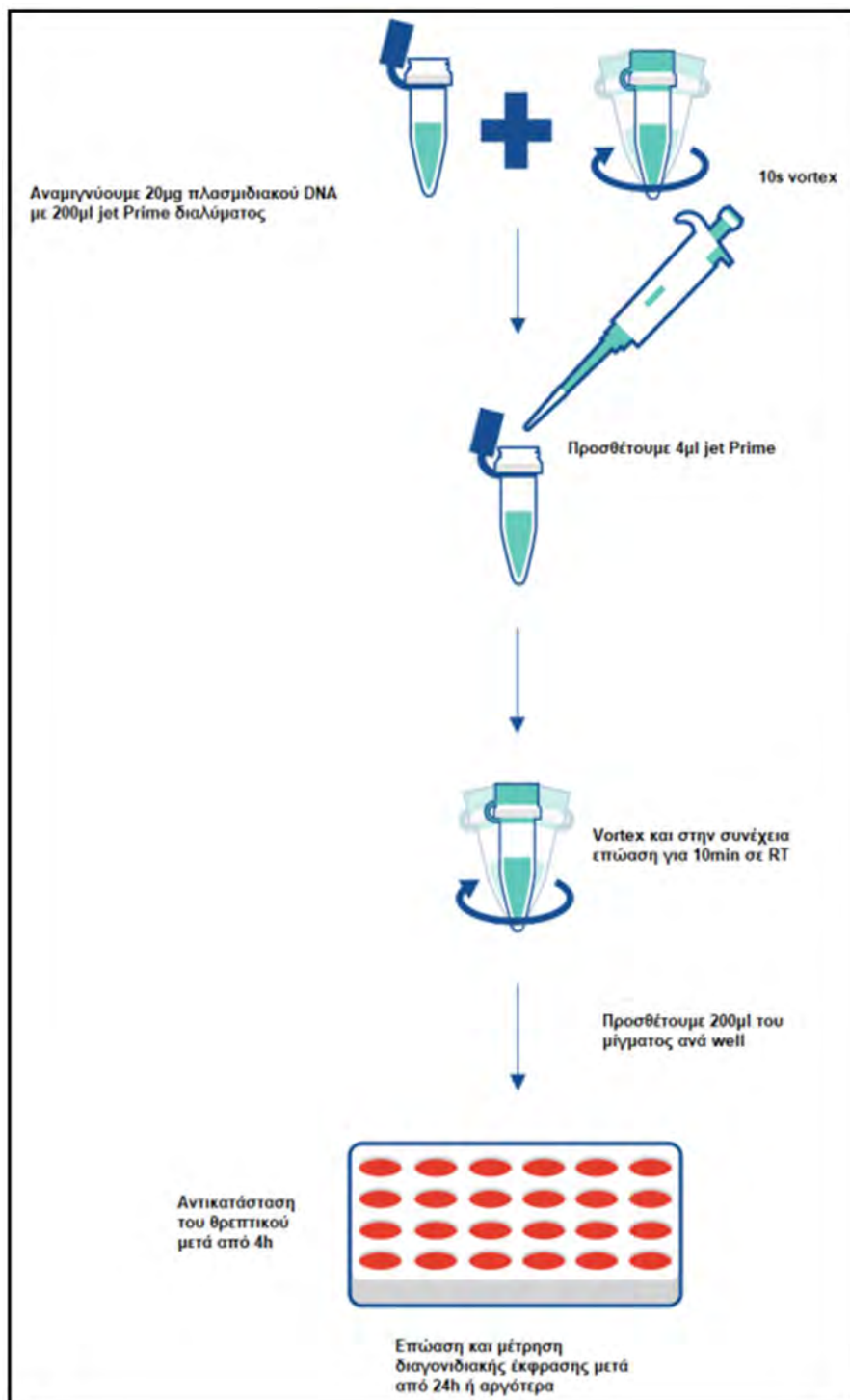
Ως μέσο για την εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) της εταιρείας Polyplus transfection, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η PEI είναι κατιονικό πολυμερές πλήρως διαλυτό σε υδατικά διαλύματα. Σχηματίζει σύμπλοκα με το DNA και λόγω της θετικά φορτισμένης επιφάνειάς της, διευκολύνεται η είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Για βέλτιστες συνθήκες διαμόλυνσης, τα κύτταρα θα πρέπει να καταλαμβάνουν 60-80% της επιφάνειας του τρυβλίου ή της φλάσκας που θα χρησιμοποιήσουμε και να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, γιατί μόνο τότε ενσωματώνουν το πλασμιδιακό DNA πιο αποτελεσματικά. Ο συνιστώμενος αριθμός κυττάρων που απαιτείται πριν την διαμόλυνση και με βάση το τρυβλίο ή την φλάσκα που χρησιμοποιείται, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 2**). Αφού τα κύτταρα αναπτυχθούν πλήρως σε πιάτο 100mm (~ $9 \times 10^6$  κύτταρα/ml) μπορούν να μεταφερθούν σε νέα πιάτα με αραιώση 1/3 από την αρχική συγκέντρωση.

**Πίνακας 2.** Συνιστώμενος αριθμός κυττάρων πριν την διαμόλυνση ανάλογα με τον τύπο του δοχείου (<https://www.polyplus-sartorius.com>).

ΔΟΧΕΙΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΑΝΑ ΦΡΕΑΤΙΟ (cm <sup>2</sup> )	ΟΓΚΟΣ ΜΕΣΟΥ ΑΝΑ ΦΡΕΑΤΙΟ (ml)
96-well	7 500 - 10 000	0.3	0.1
24-well	50 000 – 80 000	1.9	0.5
12-well	80 000 – 150 000	3.8	1
6-well / 35mm	150 000 – 250 000	9.4	2
60mm / flask 25cm <sup>2</sup>	250 000 – 800 000	25 – 28	5
100mm / flask 75cm <sup>2</sup>	$1 \times 10^6$ – $2 \times 10^6$	75 - 78.5	10
150mm / flask 175cm <sup>2</sup>	$2 \times 10^6$ – $5 \times 10^6$	153 – 175	20

Διάφορες παράμετροι δοκιμάστηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα για να καταλήξουμε στις καλύτερες συνθήκες. Όλα τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την εταιρεία OriGene (Herford, Germany). Οι τελικές συνθήκες είναι οι εξής: τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με μείγμα πλασμιδίων pCMV6-XL4-CHRNA3 ή pCMV6-XL5-CHRNA4 που κωδικοποιούν την  $\alpha 3$ - ή  $\alpha 4$ - υπομονάδα του nAChR, pCMV6-XL5-CHRNA4 ή pCMV6-XL5-CHRNA4 που κωδικοποιούν την  $\beta 4$ - ή  $\beta 2$ - υπομονάδα του nAChR, pCMV6-XL5-CHRNA2 που κωδικοποιούν την  $\beta 4$ - ή  $\beta 2$ - υπομονάδα του nAChR, pCMV6-XL5-TMEM35 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-συνοδό NACHO και pCMV6-XL5-RIC3 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-συνοδό RIC3. Χρησιμοποιήσαμε 3,7μg/πλασμίδιο για τους υποδοχείς  $\alpha 3\beta 2$  και  $\alpha 3\beta 4$  και 2,5μg για τον  $\alpha 4\beta 2$  ανά τρυβλίο 100mm καλλιέργειας και επιμολύναμε τα κύτταρα με το αντιδραστήριο PEI. Το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά ώστε το μόριο του DNA να συμπλοκοποιηθεί με το κατιονικό πολυμερές, το οποίο λειτουργεί ως μεσολαβητής για να εισαχθεί το DNA στο κύτταρο. Μετά την επώαση, το μείγμα προστίθεται στα κύτταρα κατά σταγόνες. Μετά από 4 ώρες πραγματοποιείται αντικατάσταση του υλικού με φρέσκο θρεπτικό υλικό. 24 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων, προσθέσαμε 1mM νικοτίνης (N3876, Sigma), η οποία αφαιρείται πριν την έναρξη του κυτταρικού ανοσοφθορισμού.



**Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της πλασμιδιακής επιμόλυνσης σε πλακίδιο 6 θέσεων (<https://www.polyplus-sartorius.com>).**

### 3.2.2.5 Ανάπτυξη νέας δοκιμασίας που βασίζεται στην αρχή της μεθόδου του κυτταρικού ανοσοφθορισμού

Ο κυτταρικός ανοσοφθορισμός (CBA) είναι μία μέθοδος όπου χρησιμοποιείται ευρέως στην ανοσολογία για την ανίχνευση αντισωμάτων και είναι αρκετά διαδεδομένη τα τελευταία χρόνια<sup>165</sup>. Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής έγκειται στο γεγονός ότι τα αντιγόνα δεν βρίσκονται σε διαλυτή μορφή με αβέβαιη δομή, αλλά στην μεμβράνη των κυττάρων έχοντας την φυσική τους διαμόρφωση. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται η σωστή τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης, διατηρώντας ακέραιους όλους τους πιθανούς επίτοπους.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο αυτοαντισωμάτων έναντι των υποδοχέων  $\alpha\beta 2$ ,  $\alpha\beta 4$  και  $\alpha 4\beta 2$  ήταν η εξής: 48 ώρες μετά από την επιμόλυνση των κυττάρων HEK293 και την έκφραση του επιθυμητού υποδοχέα-στόχο των αντισωμάτων, στα επιμολυσμένα κύτταρα κάνουμε πλύσεις με το διάλυμα που περιέχει DMEM\_10%FBS\_1%Pen/Strep +2,3g HEPES (**πίνακας 1**).

Μετά το πρώτο στάδιο, γίνεται επώαση των κυττάρων για 1 ώρα με δείγματα ορού ή ENY στα οποία θέλουμε να δούμε την πιθανή ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης-στόχου. Οι οροί αραιώνονται 1/10 σε διάλυμα 1% albumin/DMEM-HEPES. Στην συνέχεια, γίνονται πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα DMEM-HEPES και μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης για 10 λεπτά. Έπειτα και μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων, γίνεται επώαση για 1 ώρα με φθορίζον αντι-αντίσωμα rabbit anti-human IgG (Invitrogen) σε αραιώση 1/750 και ακολουθεί επώαση, επίσης για 1 ώρα, με φθορίζον αντίσωμα Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) ως τρίτο σε αραιώση 1/750. Όλες οι επωάσεις γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η ύπαρξη αντισωμάτων στο βιολογικό δείγμα και η πρόσδεση του φθορίζοντος αντι-αντισώματος μπορεί να ελεγχθεί με παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η χρήση τρίτου αντισώματος αύξησε το σήμα, χωρίς να αυξήσει το υπόβαθρο και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί η ευαισθησία της διαδικασίας.

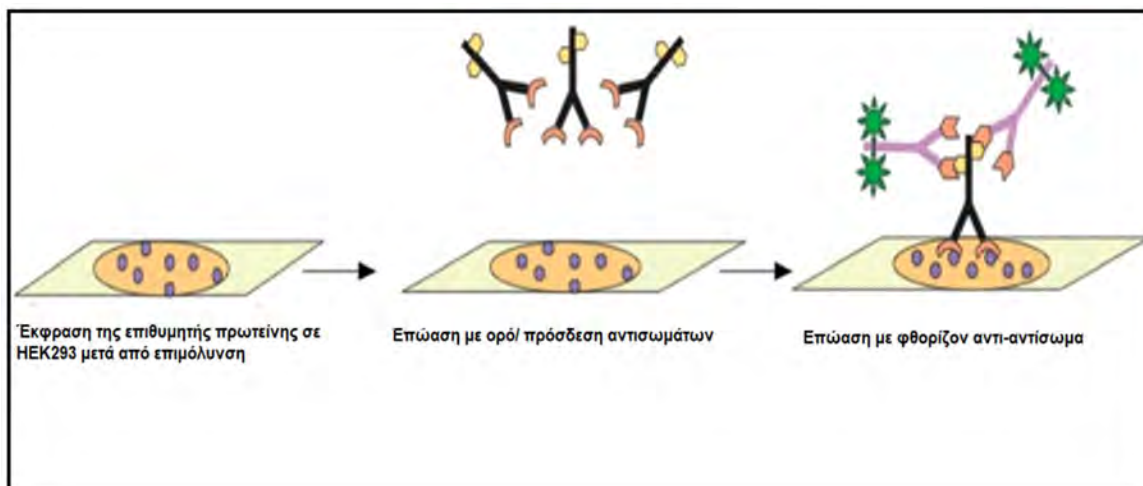
Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK, τα οποία επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη AQP4 (pCMV6-AQP4 myc flag). Οι θετικοί οροί, στην συνέχεια, ελέγχθηκαν σε σειριακές

αραιώσεις για τον προσδιορισμό του τίτλου τους, που εκφράζεται ως η υψηλότερη αραίωση στην οποία βλέπουμε θετικό σήμα. Όλοι οι οροί ελέγχθηκαν και σε κύτταρα που επιμολύνθηκαν με  $\alpha 7$ -nAChR.

Ο συνεντοπισμός των αντισωμάτων έναντι του  $\alpha 3$ -nAChR σε δείγματα ορών με μονοκλωνικό αντίσωμα αρουραίου έναντι της  $\beta 2$  (mAb295), ελέγχθηκε με συνεπώαση τους με κύτταρα που εκφράζουν τον  $\alpha 3\beta 2$ . Αφού έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων, όπως περιγράφηκε παραπάνω, στην συνέχεια έγινε επώαση για 1 ώρα με φθορίζον αντι-αντίσωμα rabbit anti-human IgG (Invitrogen) σε αραίωση 1/750 και ακολούθησε ταυτόχρονη επώαση με Alexa Fluor-488 goat anti-rat IgG (Invitrogen) σε αραίωση 1/200 και Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) σε αραίωση 1/750. Επώαση των κυττάρων μόνο με το μονοκλωνικό αντίσωμα ή μόνο με τον ορό, ακολουθούμενη από επώαση μόνο με τα αντι-αντισώματα IgG των ετερόλογων ειδών, δεν έδειξε την ύπαρξη υποβάθρου.

Όμοια ο συνεντοπισμός των αντισωμάτων έναντι του  $\alpha 4$ -nAChR σε δείγματα ορών με μονοκλωνικό αντίσωμα αρουραίου έναντι της  $\alpha 4$  (mAb299) ή έναντι της  $\beta 2$  (mAb295), ελέγχθηκε με συνεπώαση τους με κύτταρα που εκφράζουν τον  $\alpha 4\beta 2$ . Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων, ακολούθησε ταυτόχρονη επώαση για 1 ώρα με φθορίζον αντι-αντίσωμα Alexa Fluor 488 mouse anti-human IgG (Invitrogen) και φθορίζον αντι-αντίσωμα Alexa Fluor 568 goat anti-rat σε αραίωση 1/750 (Invitrogen). Επώαση των κυττάρων μόνο με το μονοκλωνικό αντίσωμα ή μόνο με τον ορό, ακολουθούμενη από επώαση μόνο με τα αντι-αντισώματα IgG των ετερόλογων ειδών, δεν έδειξε την ύπαρξη υποβάθρου.

Το φθορίζον σήμα των αντισωμάτων ενός θετικού CBA ορού, βάφτηκε με Hoechst 33258 (40044 Biotium) για να χρωματιστούν οι πυρήνες. Η χρώση αυτή σε αραίωση 1/40000 επώαστηκε ταυτόχρονα με το τρίτο αντίσωμα για τους ορούς των εξεταζομένων [Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit IgG (H+L)].



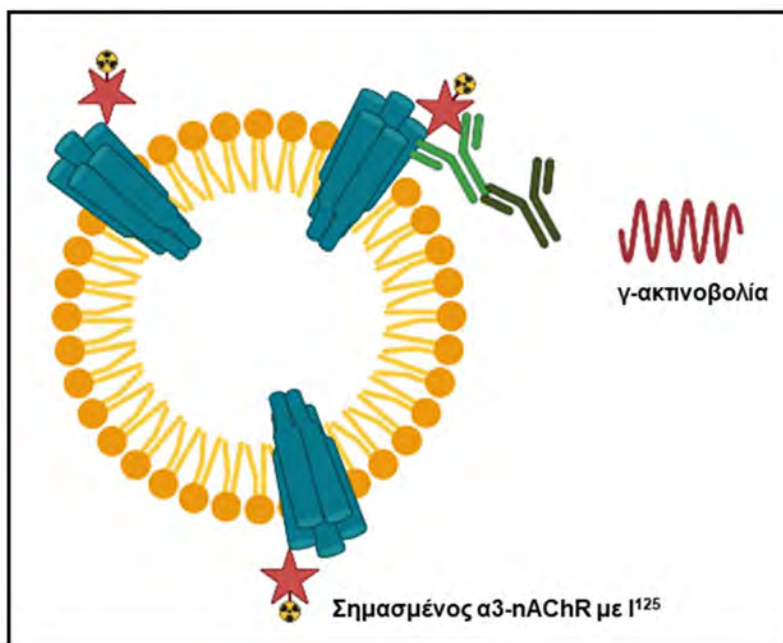
**Εικόνα 10. Αρχής της μεθόδου του κυτταρικού ανοσοθροισμού.** Κύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο επωάζονται με τον προς έλεγχο ορό και τα προσδεμένα στα κύτταρα αντισώματα ανιχνεύονται με την χρήση δεύτερων φθοριζόντων αντισωμάτων.

### 3.2.2.6 Διαδικασία Ραδιοανοσοκαθίζησης (RIPA)

Η διαδικασία ραδιοανοσοκαθίζησης (RIPA), είναι μια αρκετά ευαίσθητη τεχνική με την βοήθεια της οποίας ανιχνεύονται αντισώματα έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η αρχή λειτουργίας της βρίσκεται στην ιδιότητα που έχουν τα αντισώματα να προσδένονται ειδικά στο αντιγόνο τους σχηματίζοντας σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους. Στην πράξη το πρώτο βήμα είναι η ράδιο-σήμανση της πρωτεΐνης-αντιγόνου. Το δεύτερο βήμα είναι η επώαση του ράδιο-σημασμένου αντιγόνου με το δείγμα. Αν το δείγμα περιέχει αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης-αντιγόνου, θα δημιουργηθεί σύμπλοκο. Ακολουθεί επώαση με αντισώματα από άλλο είδος τα οποία προσδένονται στα πρώτα αντισώματα δημιουργώντας πολύ βαρύτερα σύμπλοκα που καταβυθίζονται εύκολα με φυγοκέντρηση. Εάν στο δείγμα υπήρχαν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης-αντιγόνου, στο ίζημα θα έχει εγκλωβιστεί ραδιενέργεια, η οποία θα προέρχεται από την σημασμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο. Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει πλύσεις με κατάλληλο διάλυμα άλατος που περιέχει απορρυπαντικό για την απομάκρυνση της μη προσδεμένης ραδιενέργειας και μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων. Όσο περισσότερα αντισώματα έναντι του αντιγόνου υπάρχουν στο δείγμα, τόσες περισσότερες κρούσεις στην μονάδα του χρόνου μετρώνται (**εικόνα 11**).

Στην συγκεκριμένη μελέτη, η RIPA διεξήχθη με εκχυλίσματα, σημασμένα με  $I^{125}$ -επιβατιδίνη, κυττάρων HEK293 που είχαν επιμολυνθεί με  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50.000 κύτταρα και 10.000 cpm επιβατιδίνη. Τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε 0,5% Triton/PBS για 30 λεπτά στους 4°C. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο των κυττάρων επωάστηκε με  $I^{125}$ -επιβατιδίνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Οι οροί των ασθενών επωάστηκαν με τον έμμεσα σημασμένο με  $I^{125}$   $\alpha 3$ -nAChR (10000 cpm/αντίδραση) για 2 ώρες σε RT και στην συνέχεια όλη νύχτα στους 4°C. Έπειτα χρησιμοποιήσαμε το αντι-αντίσωμα goat anti-human IgG (H+L) (RSR Ltd, Cardiff; αριθμός προϊόντος RBA/Ig100), όπου επωάστηκε με το μείγμα- οροί ασθενών και σημασμένα εκχυλίσματα κυττάρων- για 1,5 ώρες στους 4°C. Με την προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος σε κάθε αντίδραση και την φυγοκέντρηση του κάθε μείγματος, προχωρήσαμε στην μέτρηση της ραδιενέργειας των ιζημάτων σε γ-μετρητή (LB 2111 multi crystal gamma counter/ Berthold Technologies). Το όριο της θετικότητας (cutoff) ήταν 0.05nM (μέσος όρος τιμών από 20 υγιείς ελέγχους και 4SD).



**Εικόνα 11. Αρχή της διαδικασίας ραδιοανοσοκαθίζησης (RIA).** Ο υποδοχέας  $\alpha 3$ -nAChR, αφού σημανθεί με ραδιενεργό επιβατιδίνη, ένα τοξικό αλκαλοειδές με εξαιρετικά υψηλή συγγένεια για την  $\alpha 3$  και  $\alpha 4$  υπομονάδα, επωάζεται με ορούς ασθενών. Αντισώματα των ασθενών προσδένονται στην  $\alpha 3$  υπομονάδα και ανιχνεύονται με γ-μετρητή.

Όλοι οι οροί που ελέγχθηκαν με RIPA, είχαν προηγουμένως ελεγχθεί στο εργαστήριο Euro Diagnostica/Σουηδία (δείγματα από την Αθήνα) ή στο ινστιτούτο Carlo Besta (δείγματα από Ιταλία) με εκχυλίσματα κυττάρων IMR32, σημασμένα με  $I^{125}$ -επιβατιδίνη. Όλα τα θετικά δείγματα ορών που ανιχνεύθηκαν με τα μεταγενέστερα συστήματα, ήταν επίσης θετικά με τον ανασυνδυασμένο  $\alpha 3$ -nAChR, με περιστασιακές διαφορές στα επίπεδα των αντισωμάτων. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στην ειδικότητα της  $I^{125}$ -επιβατιδίνης που χρησιμοποιήθηκε την δεδομένη στιγμή, στην ποσότητα του αντιγόνου σε κάθε αντίδραση και/ή στην ετερογένεια του nAChR στα εκχυλίσματα των κυττάρων IMR32.

### **3.2.2.7 Συλλογή δειγμάτων και επιδημιολογικών δεδομένων των ασθενών με MOGAD**

Σε διάστημα δύο ετών (Ιούλιος 2016 – Ιούνιο 2018), ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι της MOG, οροί 1300 ασθενών (συμπεριλαμβανομένων 426 ασθενών από 8 συνεργαζόμενες κλινικές) που παραπέμπονταν από τους νευρολόγους τους για έλεγχο αντι-MOG, μετά από την σύμφωνη συγκατάθεση τους. Οι αντι-MOG θετικοί ασθενείς που εξετάστηκαν στις 8 κλινικές, μελετήθηκαν στην συνέχεια διεξοδικά για τα κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά τους. Επιπλέον, 142 δείγματα υγιών εξεταζομένων και 40 δείγματα ασθενών με αντισώματα έναντι της AQP4, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Δεν μπορούσαμε να έχουμε πρόσβαση στα κλινικά δεδομένα των ασθενών που παραπέμπονταν για διάγνωση ρουτίνας από άλλες κλινικές και άλλους ιατρούς.

Και οι 1300 οροί ελέγχθηκαν με live CBA, όπως έχει ήδη περιγραφεί, χρησιμοποιώντας κύτταρα HEK που εκφράζουν όλη την αλληλουχία της MOG πρωτεΐνης (Origene, Herford, Germany). Ως δευτερεύον αντίσωμα, χρησιμοποιήσαμε το Alexa Fluor-488 mouse anti-human IgG1 (A10631/Invitrogen) σε αραίωση 1/500 και στην συνέχεια προσθέσαμε τρίτο αντίσωμα Alexa Fluor-488 goat anti-mouse IgG (H+L, A1101/Invitrogen) σε αραίωση 1/750. Το όριο θετικότητας είναι η αραίωση 1/20 και η συγκεκριμένη διαδικασία θα αναφέρεται στην συνέχεια ως IgG1-CBA.

Στην συνέχεια, οι οροί και των 426 ασθενών των συνεργαζόμενων κλινικών, επανεξετάστηκαν με δύο επιπλέον CBA:

α) CBA με ζωντανά κύτταρα που εκφράζουν όλη την αλληλουχία της MOG [IgG (Fc)-CBA] και η διαδικασία είναι όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήσαμε goat anti-human IgG (Fc-specific)-Cy3 conjugated (C2571/ Sigma) σε αραιώση 1/200. Οι οροί ελέγχθηκαν σε αραιώσεις 1/20, 1/40, 1/80 και 1/160 (αραιώση που καθορίζει το όριο θετικότητας). Πριν από την χρήση του δεύτερου αντισώματος anti-human IgG (Fc-specific), σε προκαταρκτικές μελέτες χρησιμοποιούσαμε το αντίσωμα Alexa Fluor-568 goat anti-human IgG (H+L, A21090/ Invitrogen) σε αραιώση 1/750. Ως αρνητικοί μάρτυρες για όλα τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν επίσης HEK επιμολυσμένα με AQP4.

β) Ένα εμπορικό σκεύασμα με κύτταρα μονιμοποιημένα όπου ανιχνεύονται τα ολικά IgG. Η αραιώση των ορών για τον έλεγχο θετικότητας είναι 1/10, σύμφωνα με τον κατασκευαστή (Euroimmun, Lübeck, Γερμανία). Όλοι οι οροί ελέγχθηκαν επίσης με το εμπορικό kit CBA και για αντισώματα έναντι της AQP4, σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

Αντι-MOG θετικοί ασθενείς με κλινική διάγνωση αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας, εξετάστηκαν επίσης σε αρκετά επιπλέον νευρωνικά αντιγόνα συμπεριλαμβανομένων των NMDAR, GABA<sub>B</sub>R, AMPAR, CASPR2 και LGI1 καθώς και για δέσμευση στον ιππόκαμπο ή την παρεγκεφαλίδα αρουραίου με ανοσοϊστοχημεία με το αντίστοιχο εμπορικό kit από την Euroimmun.

Η δεοντολογική έγκριση για την μελέτη ελήφθη από την επιτροπή δεοντολογίας του Αιγινήτειου Πανεπιστημιακού νοσοκομείου (511/2018). Επίσης, λάβαμε ενημερωμένη συγκατάθεση για την συμμετοχή των ασθενών στην έρευνα.

## **4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### 4.1 Ταυτοποίηση ορών θετικών για αντισώματα έναντι των $\alpha 3$ -nAChRs με την μέθοδο RIPA

Δύο ομάδες ασθενών ελέγχθηκαν με την μέθοδο RIPA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR σε δείγματα ορού: (1) 55 ασθενείς με την υποψία για AAG οι οποίοι παραπέμφθηκαν από ελληνικές κλινικές στο εργαστήριο Τζάρτος Νευροδιαγνωστική και (2) 13 RIPA θετικοί ασθενείς οι οποίοι είχαν ελεγχθεί στο ινστιτούτο Carlo Besta (Μιλάνο), χρησιμοποιώντας την RIPA με εκχυλίσματα IMR32 κυττάρων, τα οποία περιέχουν  $\alpha 3$ -nAChRs, σημασμένα με I<sup>125</sup> και με επιβεβαιωμένη τελική κλινική διάγνωση. Συνολικά 6/55 ασθενείς από την ελληνική ομάδα ήταν θετικοί, 3 με υψηλό (1.2-1.5 nM) και 3 με χαμηλό (0.05-0.11 nM) επίπεδο αντισωμάτων (**πίνακας 3**).

**Πίνακας 3.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των RIPA-θετικών ασθενών. Κλινικά χαρακτηριστικά τίτλων  $\alpha 3$ -CBA και RIPA<sup>166</sup>.

No. Ασθενούς	Χώρα	Φύλο (Α/Θ)	Ηλικία έναρξης	Μήνες με συμπτώματα αυτόνομης δυσавтоνομίας	Ασθένεια	Επίπεδο αντισωμάτων βόση RIPA (nM)	Τίτλος CBA ( $\alpha 3\beta 4$ )	Τίτλος CBA ( $\alpha 3\beta 2$ )	Αναλογία τίτλων CBA	Επίπεδο (nM) στην RIPA που χρειάζεται για $\alpha 3\beta 4$
1	ΙΤ	Θ	67	180	AAG	3.35	1,000	250	4	0.034
2	ΙΤ	Α	56	48	AAG	3.22	1,000	600	1.7	0.032
3	ΙΤ	Α	77	108	AAG	2.73	1,000	250	4	0.027
4	ΙΤ	Α	65	192	AAG	2.20	1,250	250	5	0.018
5	ΙΤ	Θ	64	3	AAG	1.94	250	250	1	0.078
6	ΕΛ	Θ	70	10	AAG	1.40	1,000	1,000	1	0.014
7	ΙΤ	Θ	59	180	AAG	1.25	250	100	2.5	0.050
8	ΕΛ	Θ	67	48	AAG	1.17	300	300	1	0.039
9	ΙΤ	Θ	71	30	AAG	0.98	200	100	2	0.049
10	ΙΤ	Α	65	18	AAG	0.94	200	200	1	0.047
11	ΙΤ	Α	53	96	AAG	0.92	200	250	0.8	0.046
12	ΙΤ	Θ	66	156	AAG	0.90	200	200	1	0.045
13	ΕΛ	Α	54	2	AAG	0.83	1,000	1,000	1	0.008
14	ΙΤ	Α	49	180	AAG	0.53	200	100	2	0.027
15	ΙΤ	Α	24	18	POTS	0.13	Αρνητικό	Αρνητικό		
16	ΕΛ	Θ	35	48	POTS	0.11	Αρνητικό	Αρνητικό		
17	ΕΛ	Α	47	-	IMG*	0.06	Αρνητικό	Αρνητικό		
18	ΙΤ	Α	60	12	AAG*	0.05	10	<b>Αμφίβολο</b>	>1	0.050
19	ΕΛ	Θ	44	12	ASG*	0.05	Αρνητικό	Αρνητικό		
<b>Ασθενείς με αντισώματα κατά Hu ή VGCC</b>										

				Αντιγόνο							
20	ΕΛ	Θ		Hu <sup>+</sup>	0.11	Αρνητικό	Αρνητικό				
21	ΕΛ	A		VGCC +	0.10	Αρνητικό	Αρνητικό				
22	ΕΛ	Θ		Hu <sup>+</sup>	0.08	Αρνητικό	Αρνητικό				
23	ΕΛ	Θ		VGCC +	0.07	Αρνητικό	ΔΕ*				
24	ΕΛ	Θ		VGCC +	0.07	Αρνητικό	Αρνητικό				
25	ΕΛ	A		VGCC +	0.06	Αρνητικό	Αρνητικό				

ΔΕ\*= Δεν ελέγχθηκε

Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ότι και οι 13 ασθενείς από την ομάδα της Ιταλίας ήταν θετικοί με την μέθοδο RIPA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του α3β4-nAChR: 11 από αυτούς με μέτρια προς υψηλή συγκέντρωση αντισωμάτων (0.53-3.35 nM) και 2 με χαμηλές συγκεντρώσεις (0.05 και 0.13 nM) (**πίνακας 3**). Επιπρόσθετα, αναφορές ότι μερικοί ασθενείς με αντι-VGGG και αντι-Hu αντισώματα έχουν χαμηλούς τίτλους αντισωμάτων κατά του α3-nAChR, ελέγξαμε ορούς από 31 ασθενείς με αντι-VGCC αντισώματα και 21 από ασθενείς με αντισώματα κατά του παρανεοπλασματικού αντιγόνου Hu: 6 οροί βρέθηκαν α3-nAChR RIPA θετικοί, όλοι με χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων (0.06-0.11 nM) (**πίνακας 3**). Δηλαδή, συνολικά 25 οροί ταυτοποιήθηκαν ως RIPA θετικοί.

#### 4.2 Ανάπτυξη ευαίσθητου CBA για την ανίχνευση α3-nAChR αντισωμάτων / Βελτιστοποίηση συνθηκών

Παρατηρήσαμε ότι οι αλληλουχίες-ετικέτες myc-flag και GFP μείωναν την έκφραση των υποδοχέων και για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε υπομονάδες χωρίς αλληλουχίες-ετικέτες στα ακόλουθα πειράματα<sup>167</sup>. Ελέγξαμε την έκφραση τους με τους RIPA θετικούς ορούς και με το αντι-β2 μονοκλωνικό (mAb 295) για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη ευαίσθητου CBA.

Η έκφραση των α3β2 και α3β4 nAChRs συγκρίθηκε σε 4 διαφορετικές συνθήκες: (1) με συνέκφραση με την RIC3, (2) με συνέκφραση με τις RIC-3 και NACHO, (3) με συνέκφραση με την RIC3 και με την προσθήκη 1mM νικοτίνης στην καλλιέργεια των κυττάρων 24 ώρες μετά την επιμόλυνση και (4) με

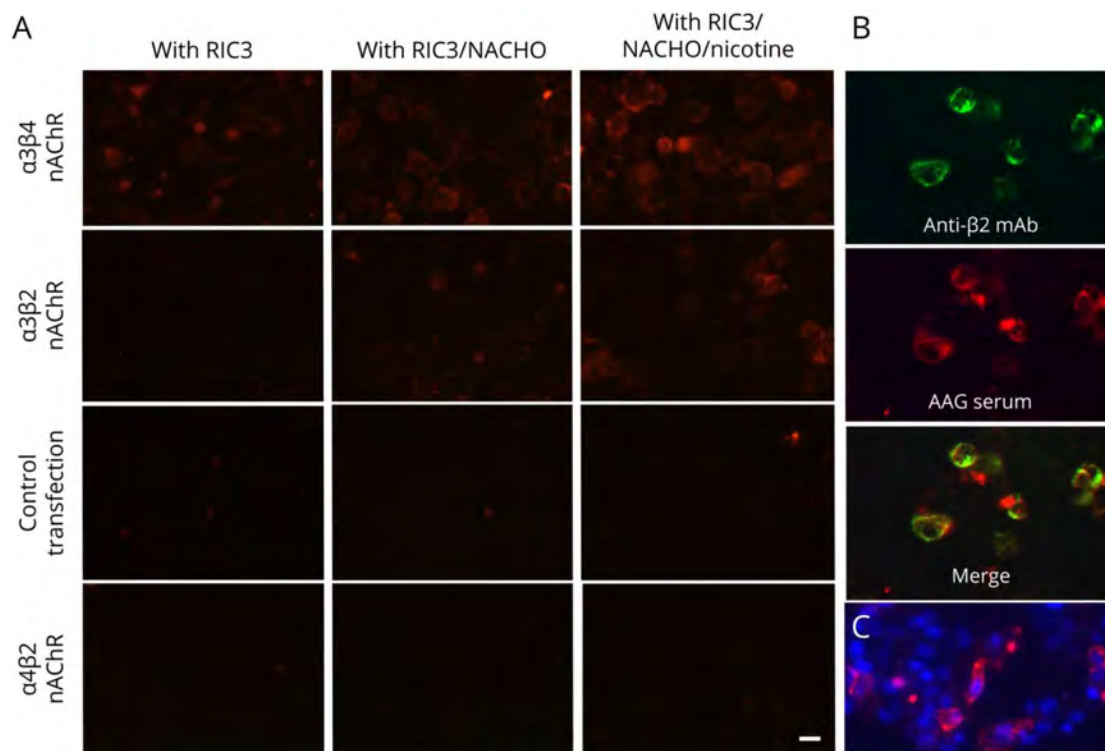
συνέκφραση με τις RIC3 και NACHO καθώς και με την προσθήκη νικοτίνης 24 ώρες μετά την επιμόλυνση (**εικόνα 12**).

**Πίνακας 4.** Αναζήτηση βέλτιστων συνθηκών για το  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR CBA<sup>166</sup>.

	CBA με κύτταρα HEK293 επιμολυσμένα με $\alpha 3\beta 4$ -nAChR, RIC3 και:			
Αριθμός ασθενών	-	NACHO	Νικοτίνη στην καλλιέργεια	NACHO και νικοτίνη
Υγιής μάρτυρας	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
5	3+	3+	3+	3+
9	1+	3+	1+	3+
10	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	1+	1+	2+
12	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	2+	1+	2+
18	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	1+
Σύνολο	<b>4+</b>	<b>9+</b>	<b>6+</b>	<b>11+</b>

(1+: ασθενώς θετικό, 3+ ισχυρά θετικό. Οι οροί ελέγχθηκαν σε αραιώση 1/100, εκτός από τον ορό 18 που ελέγχθηκε σε αραιώση 1/10)

Η συνδυασμένη χρήση τόσο των μοριακών συνοδών όσο και της νικοτίνης, οδήγησε στην ισχυρότερη έκφραση και των δύο υποδοχέων (καλύτερη χρώση των κυττάρων (**πίνακας 4**). Επομένως, χρησιμοποιήσαμε και τους τρεις αυτούς παράγοντες στα πειράματα. Ομοίως, η χρήση των τριών αυτών παραγόντων ήταν σημαντική για την έκφραση και του  $\alpha 4\beta 2$  υποδοχέα (αποτελέσματα που δεν αναφέρονται). Κανένας από τους ασθενείς των δύο ομάδων (ελληνικής και ιταλικής), ύποπτοι για αυτόνομη ανεπάρκεια, δεν είχαν αντισώματα κατά του  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. Συνεπώς HEK293 που έχουν εκφράσει τον  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, με θετικούς ορούς (νο. 2 και 13) και το αντι- $\beta 2$  μονοκλωνικό, αποκάλυψαν εξαιρετικό εντοπισμό, επιβεβαιώνοντας ότι τα αντισώματα των ορών είναι όντως δεσμευμένα στους nAChRs (**εικόνα 12**). Επιπλέον, η **εικόνα 12** δείχνει ότι τα αντισώματα ορού δεσμεύονται σε ζωντανά κύτταρα. Τα σημασμένα με αντισώματα κύτταρα, ήταν το 1/5 περίπου των συνολικών κυττάρων.



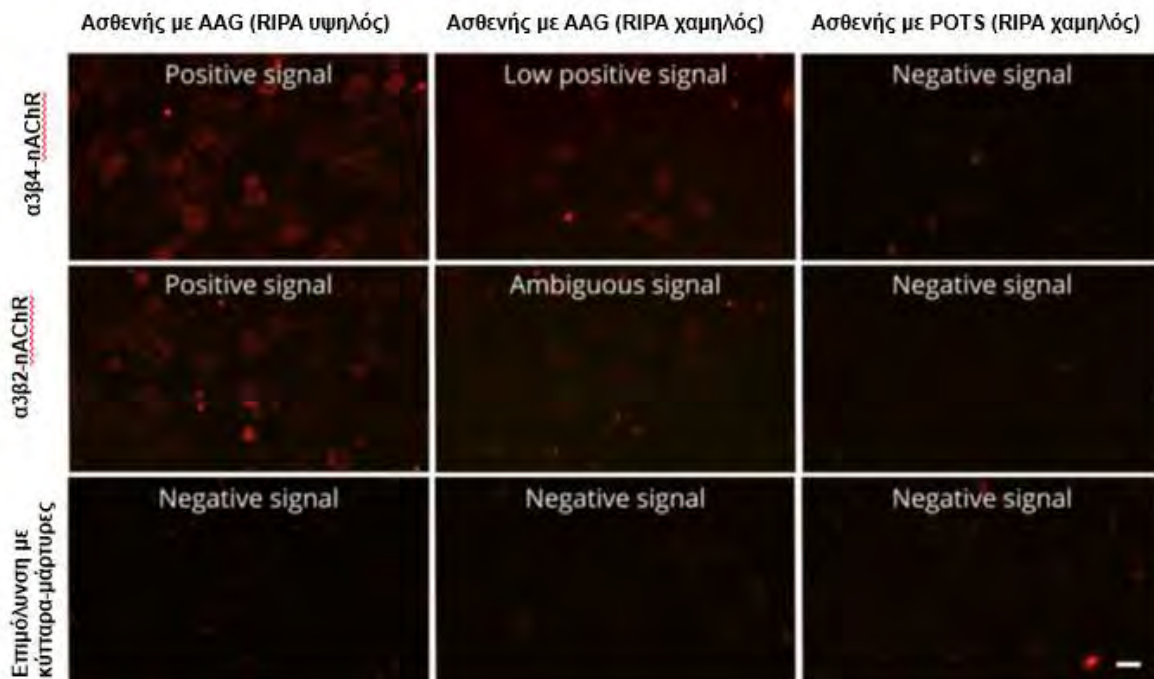
**Εικόνα 12. Βελτιστοποίηση της διαδικασίας  $\alpha 3$ -nAChR CBA.** A) Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων με  $\alpha 3$ -nAChR, NACHO και RIC3, συνεργιστικά με την προσθήκη νικοτίνης, αυξάνει σημαντικά την έκφραση των νικοτινικών υποδοχέων. Κύτταρα που εκφράζουν  $\alpha 3\beta 4$ -,  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs και AQP4, συνεπιμολύνθηκαν με 1 (RIC3) ή 2 (RIC3 και NACHO) πρωτεΐνες συνοδούς και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή μη 1nM νικοτίνης. Τα κύτταρα στην συνέχεια επώαστηκαν με τον ορό ασθενούς με AAG και θετικό τίτλο στην RIPA (Scale bar: 20 $\mu$ m). B) Συνεντοπισμός του ορού ασθενούς νο.2 με το αντι- $\beta 2$  μονοκλωνικό. C) Συνεντοπισμός της δέσμευσης του αντι- $\alpha 3$  nAChR και των πυρήνων των κυττάρων. Το φθορίζον σήμα των αντισωμάτων του ασθενούς νο.13, επώαστηκε με Hoechst για χρώση κυτταρικού πυρήνα<sup>166</sup>.

### 4.3 Επώαση ορών ασθενών με κύτταρα που εκφράζουν τον $\alpha 3$ -nAChR με την μέθοδο CBA και σύγκριση με την μέθοδο RIPA

Χρησιμοποιώντας live CBA με τους  $\alpha 3\beta 4$  και  $\alpha 3\beta 2$  υποδοχείς και με τις βέλτιστες συνθήκες έκφρασης τους, ελέγξαμε 25, θετικούς με την RIPA, ορούς και ορούς από 49 ασθενείς που παραπέμφθηκαν για  $\alpha 3$ -nAChR αντισώματα αλλά ήταν αρνητικοί με την RIPA. Για δείγματα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν 2674 δείγματα.

Δεκαπέντε ασθενείς, θετικοί στην RIPA, ήταν θετικοί και στο CBA (**πίνακας 3**). Η **εικόνα 13** δείχνει ότι επιλεγμένοι οροί δεσμεύονται στα κύτταρα με  $\alpha 3\beta 4$  και  $\alpha 3\beta 2$  υποδοχείς, αλλά όχι στα επομολυσμένα κύτταρα ελέγχου. Το **γράφημα**

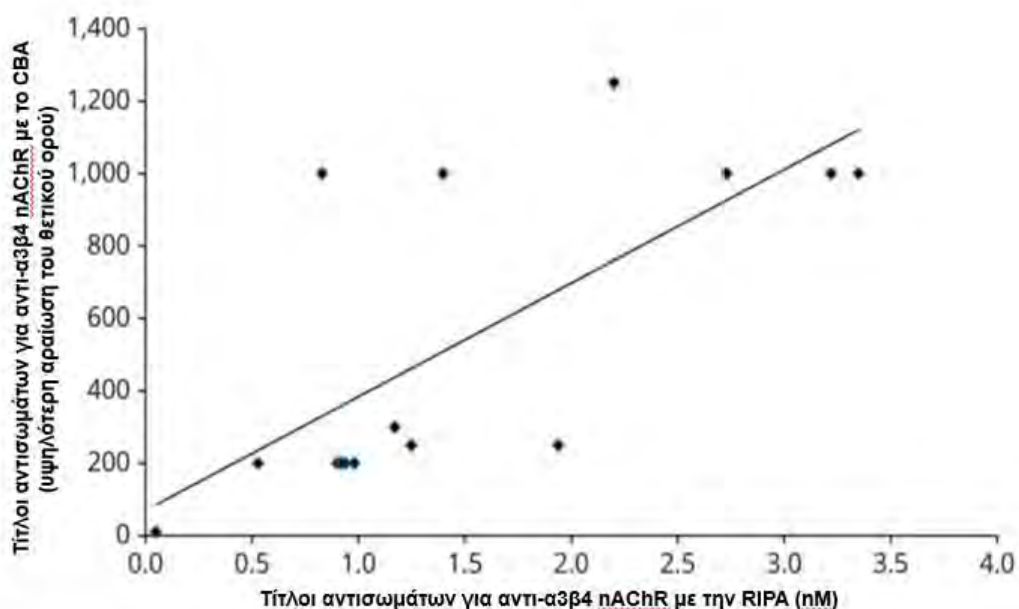
1 δείχνει τη συσχέτιση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι του  $\alpha 3$ -nAChR μεταξύ RIPA και CBA για 15 ασθενείς με αυτοάνοση αυτόνομη γαγγλιονοπάθεια (AAG). Το τεστ-κανονικότητας Shapiro-Wilk, έδειξε ότι τα δεδομένα της RIPA ακολουθούν την κανονική κατανομή ενώ τα δεδομένα του CBA όχι.



**Εικόνα 13.** Το βελτιωμένο  $\alpha 3$ -nAChR CBA ανιχνεύει αντισώματα ορών με υψηλό ή χαμηλό τίτλο στην RIPA, ειδικά για ασθενείς με AAG. Το βελτιωμένο  $\alpha 3$ -nAChR CBA, ανιχνεύει αντισώματα ορών με υψηλό ή χαμηλό τίτλο στην RIPA, ειδικά για ασθενείς με AAG. Κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν  $\alpha 3\beta 4$ - ή  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR αλλά και AQP4 (κύτταρα control), επώαστηκαν με ορούς ασθενών με AAG (υψηλού ή χαμηλού RIPA τίτλου) ή ασθενών με POTS και σημάνθηκαν με anti-human IgG (κόκκινο). Αποδεικνύεται ότι και οι δύο AAG ασθενείς έδωσαν θετική χρώση, ανεξάρτητα από τον τίτλο των αντισωμάτων τους με βάση την RIPA, ενώ ο ασθενής με POTS δεν έδωσε χρώση. Οι δύο AAG ασθενείς (RIPA χαμηλότιτλος και RIPA υψηλότιτλος) αλλά και ο ασθενής με POTS (RIPA χαμηλότιτλος), είναι οι ασθενείς νο.6 (RIPA 1.4nM, CBA 1/1000), νο.18 (RIPA 0.05nM, CBA 1/10) και νο.16 (RIPA 0.13nM, CBA αρνητικό) του πίνακα 3 αντίστοιχα<sup>166</sup>. (Scale bar: 20 $\mu$ m)

Είναι σημαντικό ότι όλα τα δείγματα ελέγχου (2674 οροί) αλλά και οι RIPA αρνητικοί οροί από τους 49 ασθενείς που παραπέμφθηκαν για αντισώματα κατά του  $\alpha 3$ -nAChR, ήταν αρνητικά στο CBA, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την ειδικότητα της δοκιμασίας (9 οροί έδειξαν ασθενή, μη ειδική χρώση, παρόμοια

με αυτή των επιμολυσμένων κυττάρων ελέγχου). Αν και οι μισοί από τους CBA-θετικούς ορούς, είχαν παρόμοιους τίτλους CBA για τους α3β4- και α3β2-nAChRs, οι υπόλοιποι είχαν υψηλότερους τίτλους με τον α3β4-nAChR. Κατά μέσο όρο, στο CBA ελέγχου του α3β4-nAChR, έχουμε δύο φορές υψηλότερους τίτλους από το CBA ελέγχου του α3β2-nAChR, αλλά κυμαίνονται από 0,8 έως 5 φορές υψηλότερα. Ωστόσο, σχεδόν όλοι οι θετικοί οροί για α3β4-nAChR ήταν επίσης θετικοί για τον α3β2-nAChR, υποδηλώνοντας ότι όλοι οι οροί έχουν αντισώματα κατά της α3 υπομονάδας, με ή χωρίς αντισώματα για τις β2 και β4 υπομονάδες.



**Γράφημα 1. Συσχέτιση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι του α3-nAChR μεταξύ RIPA και CBA για 15 ασθενείς με αυτοάνοση αυτόνομη γαγγλιονοπάθεια (AAG). Το τεστ-κανονικότητας Shapiro-Wilk, έδειξε ότι τα δεδομένα της RIPA ακολουθούν την κανονική κατανομή ενώ τα δεδομένα του CBA όχι (RIPA Shapiro-Wilk  $p=0.109$ , CBA Shapiro-Wilk  $p=0.002$ ,  $r=0.71$ ,  $R^2=0.50$ )<sup>166</sup>.**

Αν και οι περισσότεροι CBA-θετικοί οροί είχαν υψηλούς τίτλους RIPA και οι CBA-αρνητικοί οροί είχαν χαμηλούς τίτλους, προφανώς η συγκέντρωση των αντισωμάτων δεν ήταν ο περιοριστικός παράγοντας για το θετικό αποτέλεσμα στο CBA, επειδή το CBA θα μπορούσε να ανιχνεύσει αποτελεσματικά χαμηλές συγκεντρώσεις αντισωμάτων σε ασθενείς με AAG. Ο **πίνακας 3** (τελευταία στήλη) παρουσιάζει την υπολογισμένη ελάχιστη τιμή στην RIPA, η οποία θα

χρειαζόταν για θετικό αποτέλεσμα στο CBA (στην εγκεκριμένη αραίωση 1/10). Η ελάχιστη τιμή στην RIPA που χρειάζεται για το θετικό αποτέλεσμα στο CBA, προκύπτει από την αναλογία:  $[RIPA]/[CBA]$  πολλαπλασιασμένο επί 10 (επειδή η αραίωση του ορού είναι 1/10). Αποδεικνύεται ότι ένας μέσος όρος  $0.038 \pm 0.018$  nM τιμής RIPA θα ήταν επαρκής για θετικό αποτέλεσμα στο CBA. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η τιμή cut-off στην RIPA είναι 0.05 nM, συμπεραίνουμε ότι το CBA είναι τουλάχιστον εξίσου ευαίσθητη τεχνική με την RIPA.

#### **4.4 Ανωτερότητα του CBA στην ανίχνευση αντι-α3 σύμφωνα με τον κλινικό χαρακτηρισμό ασθενών**

Ο κλινικός χαρακτηρισμός 19-RIPA θετικών, ύποπτων για AAG, ασθενών, έδειξε ότι οι 15 είχαν AAG (με συμπτώματα συμπεριλαμβανομένου της ορθοστατικής υπότασης, εξασθενημένης ανταπόκρισης της κόρης στο φως, στυτική δυσλειτουργία, δυσκοιλιότητα, συμπτώματα στην ουροδόχο κύστη, απώλεια εφίδρωσης, ζαλάδα και ξηρότητα στο στόμα ή/και ξηροφθαλμία, χωρίς πρόσθετα συμπτώματα από το περιφερικό νευρικό σύστημα ή το ΚΝΣ) ενώ οι υπόλοιποι 4 ασθενείς είχαν άλλες νευρολογικές παθήσεις.

Ωστόσο, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις αντισωμάτων με την RIPA και οι 14 ασθενείς με μέτρια προς υψηλή συγκέντρωση αντι-α3 είχαν AAG, ενώ μόνο ένας από τους πέντε ασθενείς με χαμηλό τίτλο RIPA είχε AAG. Μεταξύ των υπόλοιπων 4 ασθενών με χαμηλό τίτλο στην RIPA, δύο είχαν POTS, ένας είχε αυτοάνοση αισθητήρια γαγγλιονοπάθεια με νόσο Sjögren και ένας είχε φλεγμονώδη μυεντερική γαγγλιονοπάθεια. Ενδιαφέρον είναι ότι με το CBA, σε αντίθεση με την RIPA, ανιχνεύθηκαν αντι-α3 αντισώματα επιλεκτικά και στους 15 ασθενείς με AAG, ανεξάρτητα των επιπέδων στην RIPA, αλλά σε κανέναν από τους 4 ασθενείς χωρίς AAG, παρά το θετικό αποτέλεσμα στην RIPA (100% ειδικότητα για την AAG).

Ο ασθενής νο. 18, με χαμηλό τίτλο στην RIPA και οριακά θετικό αποτέλεσμα στο CBA, είχε μία περιορισμένη μορφή AAG (απώλεια εφίδρωσης, ξηροφθαλμία και ξηρότητα στο στόμα, ζαλάδα και ένα παροδικό επεισόδιο υπότασης). Επιπλέον, κανένας από τους 6 RIPA-θετικούς ασθενείς με αντισώματα έναντι VGCC ή Hu δεν ήταν θετικός στο CBA. Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας από

αυτούς τους ασθενείς δεν είχε αναφέρει τυχόν χαρακτηριστικά της δυσавтоνομίας.

**Πίνακας 5 . Κλινικές πληροφορίες ασθενών με υποψία AAG, θετικοί για αντισώματα έναντι του α3-nAChR.** Συγκεντρωτικές πληροφορίες ασθενών, σημαντικές για την κλινική κατάταξη των αντι-α3 θετικών ασθενών. (A) Στοιχεία χώρας προέλευσης, φύλου, ηλικίας έναρξης συμπτωμάτων, τελικής διάγνωσης και διάρκεια μηνών με συμπτώματα δυσавтоνομίας. Επιπλέον, καταγραφή των συμπτωμάτων αυτόνομης εκδήλωσης για τον κάθε ασθενή (B)<sup>166</sup>.

A)

No. Ασθενούς	Χώρα Προέλευσης	Φύλο (Α/Θ)	α3-nAChR αντισώματα	Τελική Διάγνωση	Ηλικία έναρξης	Μήνες με συμπτώματα δυσавтоνομίας (μέχρι την ημερ.εγγραφής)
1	ΙΤ <sup>α</sup>	Θ	RIA+/CBA+	AAG	67	180
2	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG	56	48
3	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG	77	108
4	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG	65	192
5	ΙΤ	Θ	RIA+/CBA+	AAG	64	3
6	ΕΛ <sup>β</sup>	Θ	RIA+/CBA+	AAG	70	10
7	ΙΤ	Θ	RIA+/CBA+	AAG	59	180
8	ΕΛ	Θ	RIA+/CBA+	AAG	67	48
9	ΙΤ	Θ	RIA+/CBA+	AAG	71	30
10	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG	65	18
11	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG	53	96
12	ΙΤ	Θ	RIA+/CBA+	AAG	66	156
13	ΕΛ	Α	RIA+/CBA+	AAG	54	2
14	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG	49	180
15	ΙΤ	Α	RIA+/CBA-	POTS	24	18
16	ΕΛ	Θ	RIA+/CBA-	POTS	35	48
17	ΕΛ	Α	RIA+/CBA-	IMG*	47	-
18	ΙΤ	Α	RIA+/CBA+	AAG <sup>#</sup>	60	12
19	ΕΛ	Θ	RIA+/CBA-	ASG*	44	12

\***IMG**: φλεγμονώδης μεντερική γαγγλιονοπάθεια, **ASG**: αυτοάνοση αισθητηριακή γαγγλιονοπάθεια, **#AAG**: περιορισμένα συμπτώματα AAG (με παροδικό επεισόδιο υπότασης), <sup>α</sup>**ΙΤ**: Ιταλία, <sup>β</sup>**ΕΛ**=Ελλάδα

B)

ΑΥΤΟΝΟΜΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ						
No. Ασθενούς	Ορθοστατική υπόταση χωρίς αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό	Σοβαρή δυσκοιλιότητα	Κατακράτηση κύστης	Απώλεια εφίδρωσης	Λιποθυμία	Ξηροφθαλμία και Ξηροστομία
1	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
2	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
3	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
4	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
5	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
6	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
7	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
8	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
9	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
10	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
11	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Ακράτεια ουροδόχου κύστης	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
12	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
13	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
14	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
15	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
16	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
17	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
18	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
19	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ

#### 4.5 Κατηγορίες των IgGs και υποκατηγορίες των αντισωμάτων έναντι του α3-ηAChR που προσδιορίζονται από το CBA

Προσδιορίσαμε την τάξη/υποτάξη των ανοσοσφαιρινών έναντι του α3-ηAChR με το CBA, καθώς αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεια τους. Συγκεκριμένα, οι οροί επωάστηκαν με επιμολυσμένα με α3β4-ηAChR κύτταρα, σε αραιώση 1/10. Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων, προσθέσαμε mouse anti-human IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4 (όλα τα αντισώματα από την Invitrogen) σε αραιώση 1/500 ή IgM σε αραιώση 1/200. Στην συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε ως 3<sup>ο</sup> αντίσωμα Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG σε αραιώση 1/750. Ο **πίνακας 6** δείχνει ότι όλοι οι θετικοί οροί που βρέθηκαν με το CBA, περιέχουν αντισώματα της υποκατηγορίας IgG1 που δεσμεύει το

συμπλήρωμα. Επιπλέον, 4 οροί περιείχαν επίσης IgG2 και/ή IgG3 ή IgM αντισώματα.

**Πίνακας 6. Τάξη και υποτάξη ανοσοσφαιρίνης των CBA θετικών ορών<sup>166</sup>.**

No. Ασθενούς (όπως στον πίνακα 3)	Ig κατηγορία, υποκατηγορία				
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
<b>CBA για α3-nAChR</b>					
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-
4	+	-	-	-	+
5	+	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-
8	+	-	+	ΔΕ*	-
9	+	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-

(ΔΕ\*: δεν ελέγχθηκε, + θετικό, - αρνητικό)

#### **4.6 Ανάπτυξη ευαίσθητου CBA για την ανίχνευση α4-nAChR αντισωμάτων/ Βελτιστοποίηση συνθηκών**

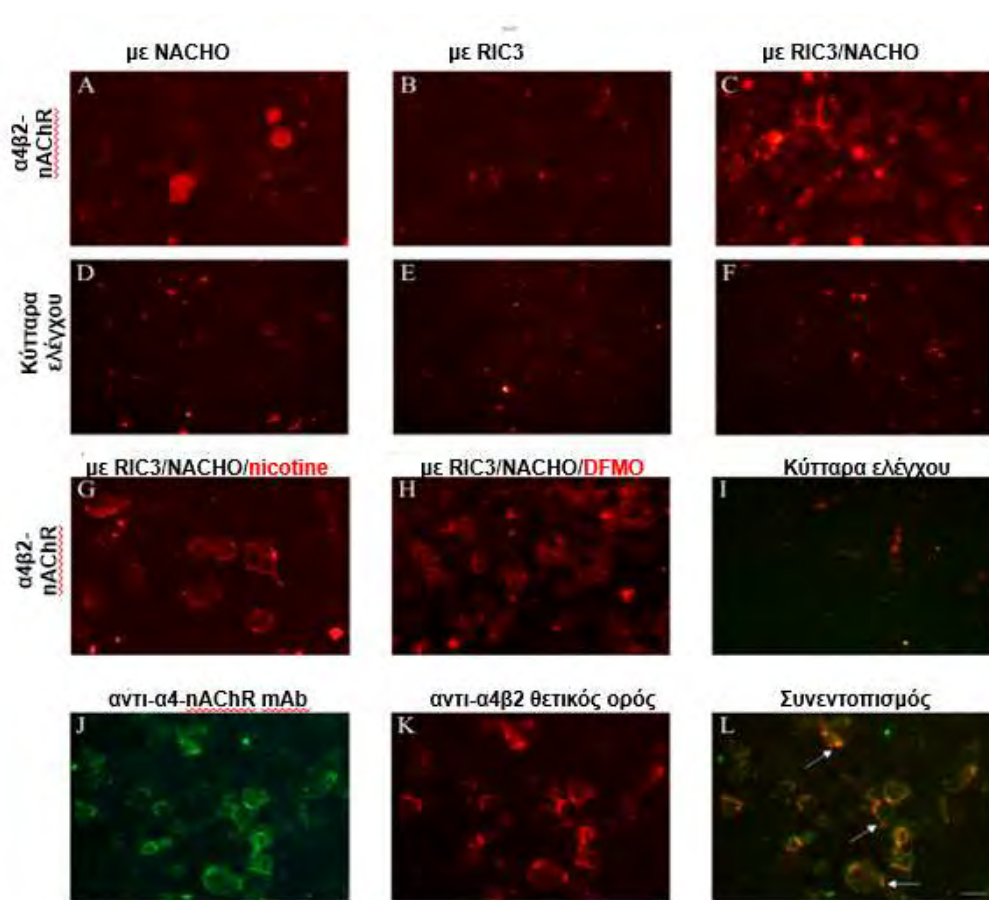
Για την αύξηση της έκφρασης του α4β2-nAChR, ελέγξαμε και συγκρίναμε τις εξής συνθήκες:

α) συνέκφραση των υπομονάδων α4- και β2-nAChR με τις πρωτεΐνες συνοδούς RIC3 και NACHO και στην συνέχεια προσθήκη στην καλλιέργεια για 24 ώρες 0.5mM, 1mM, 3mM και 5mM DFMO. Μια πρόσφατη δημοσίευση έδειξε ότι ο προσδέτης DFMO (difluoromethylornithine) ενισχύει τα επίπεδα έκφρασης των α7- και α4β2-nAChRs, αναστέλλοντας τη σύνθεση πολυαμίνης που προκαλείται κανονικά από την ακετυλοτρανσφεράση σπερμίνης (SAT1) και

αναστέλλει την έκφραση της  $\alpha 4\beta 2$ <sup>168</sup>. Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) και οι πολυαμίνες παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κυτταρική αντιγραφή και διαφοροποίηση εντός του εγκεφάλου και επιπλέον, οι πολυαμίνες ρυθμίζουν την λειτουργία των nAChR<sup>169</sup>.

β) Συνέκφραση των υπομονάδων  $\alpha 4$ - και  $\beta 2$ -nAChR με τις πρωτεΐνες συνοδούς RIC3 και NACHO και στην συνέχεια προσθήκη στην καλλιέργεια 1mM νικοτίνης, επίσης για 24 ώρες.

γ) Συνέκφραση των υπομονάδων μόνο με RIC3 και NACHO. Φάνηκε ότι η έκφραση του υποδοχέα βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη 5mM DFMO (εικόνα 14).



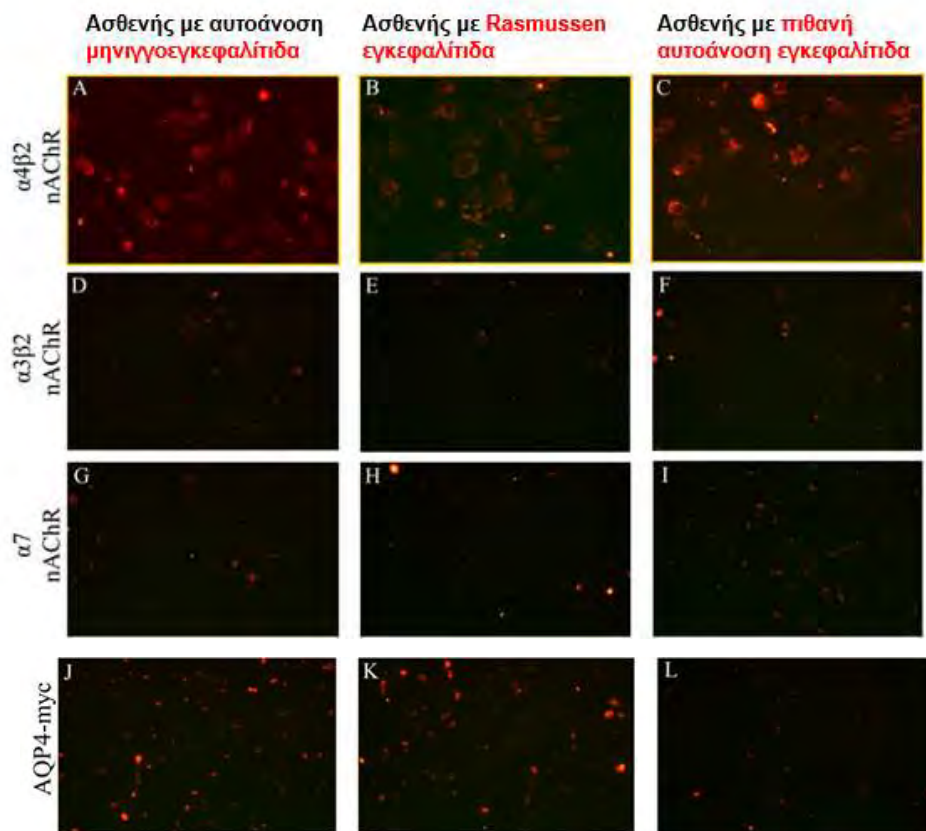
**Εικόνα 14. Βελτιστοποίηση της διαδικασίας  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR CBA.** Σύγκριση συνθηκών για την αύξηση της έκφρασης του  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. Η συνεπιμόλυνση των κυττάρων HEK293 με τα πλασμίδια  $\alpha 4$ - και  $\beta 2$ - nAChRs και κάθε πρωτεΐνη-συνοδό NACHO (A) και RIC3 (B) ξεχωριστά, δεν είχε αποτελεσματική ενίσχυση της έκφρασης των  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs στην επιφάνεια των κυττάρων. Ωστόσο, η συνεπιμόλυνση και με τις δύο πρωτεΐνες-συνοδούς NACHO και RIC3 (C), αύξησε την έκφραση των υποδοχέων.

Τα κύτταρα ελέγχου, επιμολυσμένα με AQP4, δεν δέσμευσαν τον ορό (D-F). Τα αντισώματα του θετικού ορού (αραίωση ορού 1/10), δεσμεύονται σε κύτταρα HEK293, που έχουν συνεπιμολυνθεί με τις υπομονάδες  $\alpha 4$ - και  $\beta 2$ -nAChR αλλά και τα πλασμίδια των πρωτεϊνών-συνοδών RIC3 και NACHO παρουσία 1mM νικοτίνης (G) ή 5mM DFMO (H) για 24 ώρες και οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης των  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs. Φαίνεται πως η προσθήκη τόσο της νικοτίνης όσο και του DFMO ενισχύουν παρόμοια το σήμα. Κύτταρα HEK που εκφράζουν AQP4 (κύτταρα ελέγχου) δεν δέσμευσαν τον ορό (I). Χρώση με διπλό ανοσοφθορισμό σε κύτταρα HEK που έχουν επιμολυνθεί με  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα (αντι- $\alpha 4$  mAb) (J) και θετικούς ορούς από ασθενείς με AES (K). Η επικαλυπτόμενη ανοσοαντιδραστικότητα (λευκά βέλη) του mAb και του θετικού ορού, επιβεβαίωσαν την ειδικότητα του  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR CBA. (Scale bar: 20 $\mu$ m)

#### 4.7 Ταυτοποίηση θετικών ορών για αντισώματα έναντι των $\alpha 4$ -nAChRs με την μέθοδο CBA

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο του live CBA, ελέγξαμε για αντι- $\alpha 4\beta 2$  nAChR αντισώματα, 1752 δείγματα ασθενών με «υποψία» AES. Από τα δείγματα αυτά, βρήκαμε 3 θετικούς ασθενείς. Όλοι οι CBA-θετικοί οροί είχαν αντι- $\alpha 4$  αντισώματα και αυτό αποδεικνύεται με το γεγονός ότι κανένας ορός δεν είχε αντισώματα έναντι των  $\alpha 3\beta 2$ - και  $\alpha 7$ -nAChRs. Στην **εικόνα 15** φαίνεται η δέσμευση των θετικών ορών σε κύτταρα επιμολυσμένα με  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR αλλά όχι σε κύτταρα επιμολυσμένα με τους  $\alpha 3\beta 2$ -,  $\alpha 7$ -nAChRs καθώς και στην πρωτεΐνη-μάρτυρα (κύτταρα ελέγχου). Τα ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά των τριών ασθενών, εμπίπτουν στο φάσμα του AES. Συγκεκριμένα, ένας ασθενής είχε εγκεφαλίτιδα Rasmussen, ένας αυτοάνοση μηνιγγοεγκεφαλομυελίτιδα και ο τρίτος αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα.

Επιπλέον, ελέγξαμε 1203 δείγματα ασθενών-μαρτύρων με άλλες νευροψυχιατρικές ασθένειες, οι οποίοι παραπέμφθηκαν για έλεγχο αντισωμάτων έναντι των  $\alpha 4\beta 2$ - και  $\alpha 7$ -nAChRs και ήταν αρνητικοί στο CBA.



**Εικόνα 15. Ανίχνευση αντι- $\alpha 4$  nAChRs αντισωμάτων σε δείγματα ασθενών.** Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν  $\alpha 4\beta 2$ -,  $\alpha 3\beta 2$ - ή  $\alpha 7$ -nAChRs αλλά και την πρωτεΐνη-μάρτυρα (AQP4-myc), επώαστηκαν με ορούς ασθενών με αυτοάνοση μηνιγγοεγκεφαλομυελίτιδα, εγκεφαλίτιδα Rasmussen ή από ορό ασθενούς με πιθανή αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα. Στην συνέχεια τα κύτταρα σημάνθηκαν με φθορίζον αντι-ανθρώπινο IgG αντίσωμα (κόκκινο χρώμα). Φαίνεται ότι και οι τρεις ασθενείς που ανήκουν στο φάσμα του AES έδωσαν θετική χρώση για τα αντι- $\alpha 4$  nAChR αντισώματα, ενώ δεν έδωσαν χρώση για τα αντι- $\alpha 3\beta 2$ , αντι- $\alpha 7$  και αντι-AQP4 αντισώματα. (Scale bar: 20 $\mu$ m)

**Πίνακας 7. Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των αντι-α4β2 θετικών ασθενών**

<b>Ασθενείς</b>	<b>Κλινικά ευρήματα</b>	<b>Εργαστηριακά ευρήματα</b>
Ασθενής 1	Μετα-ϊικός πονοκέφαλος, εμετός και αυχενική δυσκαμψία, αναστολή των κινήσεων του εντέρου, κατακράτηση ούρων	anti-AQP4 (-), anti-MOG (-) αρνητικό treponema pallidum, borrelia, ιό του δυτικού Νείλου παρνεοπλασματικά Abs (-)
Ασθενής 2	Εστιακές επιληπτικές κρίσεις, αδυναμία των αριστερών μυών του προσώπου, αριστερή ημιπάρεση	mGluR3(-)
Ασθενής 3	Αλλοιωμένο επίπεδο συνείδησης (ψυχιατρικά συμπτώματα, σύγχυση, καθυστέρηση), δυσκαμψία	(-) anti-GAD, anti-GFAP

## 4.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ MOGAD

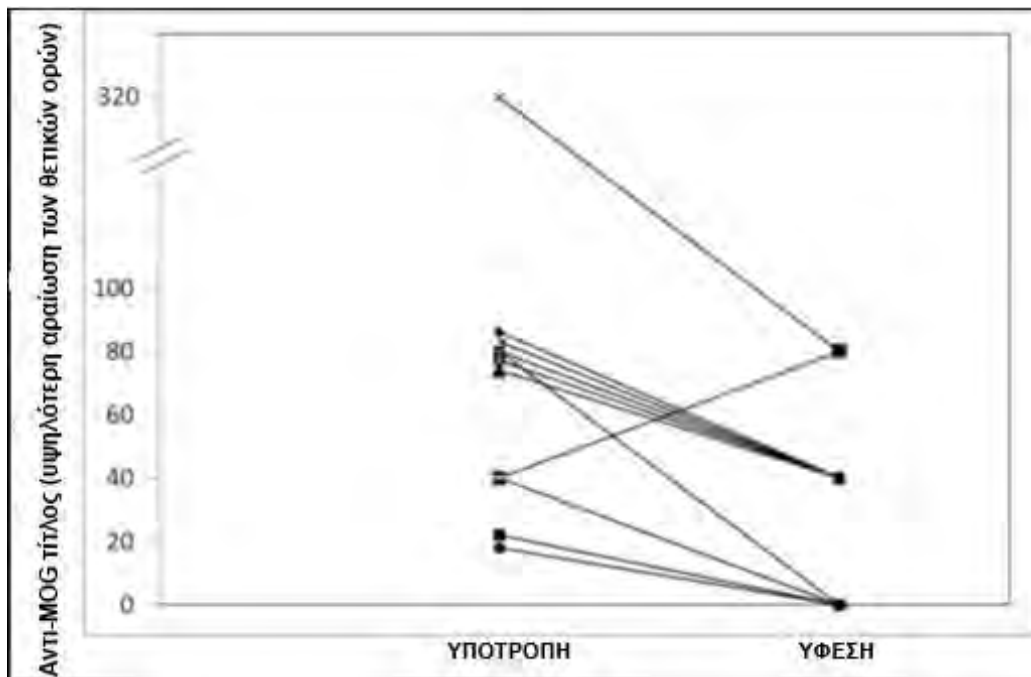
### 4.8.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Από τους 1300 ορούς που ελέγξαμε για αντι-MOG αντισώματα, 41 ασθενείς (3,2%) βρέθηκαν οροθετικοί για IgG1 αντισώματα έναντι της MOG. Συγκριτικά την ίδια περίοδο εντοπίσαμε 37 (2,1%) αντι-AQP4 ασθενείς από 1800 εξεταζομένους (συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων από τους 1300 ασθενείς). Κανείς ασθενής δεν είχε αντισώματα και για τα δύο αντιγόνα (MOG και AQP4). Κλινικά, ορολογικά και ακτινολογικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα και αναλύθηκαν για τους 21 από τους 41 θετικούς αντι-MOG IgG1, από το σύνολο των 426 ασθενών που παραπέμφθηκαν στις συνεργαζόμενες κλινικές.

### 4.8.2 Εργαστηριακά δεδομένα ασθενών με αντι-MOG αντισώματα

Κατά την διάρκεια των φάσεων υποτροπής και ύφεσης της νόσου, υπήρξαν αλλαγές στους τίτλους αντι-MOG 11 ασθενών. Στο **γράφημα 2** φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ των τίτλων αντι-MOG και της σοβαρότητας της νόσου για 10/11 μεμονωμένους ασθενείς, ενώ φαίνεται ότι 4 ασθενείς έγιναν αντι-MOG οροαρνητικοί κατά την φάση ύφεσης της νόσου (ασθενείς νο. 3, 13, 18 και 21). Οι 3 από τους 4 αυτούς ασθενείς που μετατράπηκαν σε οροαρνητικούς, ήταν υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Μόνο στον ασθενή με αρ.15 (με διάγνωση εγκεφαλίτιδας) ο τίτλος των αντι-MOG αυξήθηκε κατά την διάρκεια της ύφεσης, χωρίς θεραπεία. Αν και υπήρχαν υψηλοί και χαμηλοί τίτλοι μεταξύ των ασθενών σε κάθε κλινική κατάσταση, ο μέσος τίτλος σε υποτροπή ήταν  $1/84 \pm 1/82$ , ενώ σε ύφεση ήταν  $1/33 \pm 1/30$ .

Επιπλέον, ελέγχθηκαν για αντι-MOG αντισώματα, 8 δείγματα ENY οροθετικών ασθενών. Μόνο το ENY του ασθενούς 15 είχε αντι-MOG αντισώματα (με διάγνωση φλοιώδους εγκεφαλίτιδας, απουσία ολιγοκλωνικών ζωνών). Ολιγοκλωνικές IgG ζώνες στο ENY ανιχνεύθηκαν σε 5/16 ασθενείς, 4 από τους οποίους είχαν εγκεφαλικές βλάβες. Κανένας από αυτούς με τελική διάγνωση ON, δεν είχε ανιχνεύσιμες ολιγοκλωνικές ζώνες.



**Γράφημα 2. Συσχέτιση των αντι-MOG τίτλων με τις κλινικές διακυμάνσεις (υποτροπή και ύφεση) των ασθενών. Συλλέχθηκαν 11 οροί, θετικών αντι-MOG ασθενών, σε μεταγενέστερο στάδιο, ενώ στην ύφεση ελέγχθηκε ο τίτλος των IgG1 αντι-MOG. Το γράφημα δείχνει την αλλαγή του τίτλου για κάθε ασθενή μεταξύ των δύο κλινικών καταστάσεων<sup>170</sup>.**

### 4.8.3 Υποτροπές και ανταπόκριση στην θεραπεία

Συνολικά 9/21 ασθενείς παρουσίασαν υποτροπή τουλάχιστον μία φορά κατά την διάρκεια 93,6 μηνών, που είναι ο μέσος όρος παρακολούθησης, με  $0.73 \pm 0.82$  υποτροπές ετησίως. Μεταξύ των 9 ασθενών που υποτροπίασαν, 6 είχαν ON κατά την έναρξη (από τους συνολικά 10 ασθενείς με ON), το 1/4 είχε μυελίτιδα, το 1/2 είχε εγκεφαλίτιδα και 1/3 είχε άτυπη MS. Κατά την διάρκεια της έξαρσης της νόσου, σχεδόν όλοι οι ασθενείς (18/19) θεραπεύτηκαν με στεροειδή και ανταποκρίθηκαν θετικά στην θεραπεία. 16 ασθενείς (16/21) έλαβαν θεραπεία συντήρησης, ενώ 5 ασθενείς δεν έλαβαν ανοσοθεραπεία συντήρησης.

Συνολικά, το μέσο ποσοστό υποτροπής στην ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία (συμπεριλαμβανομένου των ασθενών που δεν έλαβαν θεραπεία για >6 μήνες), ήταν  $1.1 \pm 1.8$ / χρόνο (για 13/21 ασθενείς), ενώ στην ομάδα που έλαβε θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά για περισσότερο από 6 μήνες ήταν  $0.52 \pm 0.7$ / χρόνο (για 13/21 ασθενείς). Ο ασθενής με αρ.20 που είχε λάβει ειδικές για την

MS θεραπείες, είχε περισσότερες από 10 υποτροπές κατά την διάρκεια της θεραπείας, σε 10 χρόνια και ο ασθενής με αρ.16 είχε υποτροπή μετά την λήψη ιντερφερόνης-b (IFN-b).

#### **4.8.4 Σύγκριση του IgG1-CBA με τα άλλα δύο επικρατή CBA**

Συγκρίναμε την αποτελεσματικότητα του IgG1-CBA με αυτή των δύο άλλων δημοφιλών αντι-MOG CBA (του live IgG-CBA και του εμπορικού CBA). Στην αρχή, συγκρίναμε τα δύο «in house» CBA, με ζωντανά κύτταρα, υιοθετώντας τις συνιστώμενες αραιώσεις ορού (1/20 για το IgG1-CBA και 1/160 για το ολικό-IgG CBA). Ελέγξαμε την ειδικότητα του IgG αντι-MOG CBA, χρησιμοποιώντας ως δεύτερο αντίσωμα anti-human IgG (H+L) [IgG (H+L)-CBA], σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες<sup>171</sup>. 10 από τους 142 (7%) ορούς από υγιείς μάρτυρες, βρέθηκαν θετικοί σε αραιώση 1/80, εκ των οποίων 4 παρέμειναν θετικοί στην οριακή αραιώση (cutoff) 1/160. Αυτή η παρατήρηση και η πιθανότητα ότι το anti-human IgG (H+L) μπορεί να αλληλεπιδρά και με άλλους υπότυπους ανοσοσφαιρίνης, λόγω της κοινής L-αλυσίδας μεταξύ όλων των κατηγοριών των ανοσοσφαιρινών, συμπεριλαμβανομένων και των λιγότερο ειδικών IgMs<sup>153</sup>, μας ώθησε στο να εξετάσουμε περαιτέρω τους 10 αυτούς μάρτυρες, μαζί με επιπλέον 70 δείγματα (από τα 142 δείγματα control), χρησιμοποιώντας ως δεύτερο αντίσωμα το ειδικό anti-human IgG (Fc-specific)<sup>160</sup>.

Με αυτό το αντι-αντίσωμα μόνο ένα δείγμα από τους υγιείς μάρτυρες βρέθηκε θετικός σε αραιώσεις 1/80 και 1/160 και κανένας από τις επιπλέον 70 περιπτώσεις. Επομένως, υιοθετήσαμε το anti-human IgG (Fc-specific) ως δεύτερο αντίσωμα για τα IgGs στο αντι-MOG CBA. Στην συνέχεια, αυτοί οι υγιείς μάρτυρες (δηλαδή οι 10 μαζί με τους 70 που ελέγχθηκαν για IgG-Fc), ελέγχθηκαν με το IgG1-CBA σε δοκιμαστική αραιώση 1/20 και κανένα δείγμα δεν βρέθηκε θετικό.

**Πίνακας 8. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ασθενών και με τα τρία CBA.** Από τους 426 ασθενείς των 8 συνεργαζόμενων κλινικών, 21 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί με το IgG1-CBA, 15 ασθενείς με το IgG-CBA και 18 ασθενείς με το εμπορικό CBA<sup>170</sup>.

Αριθμός Ασθενών	Τελική Διάγνωση	IgG1 anti-MOG (≥1/20)	IgG anti-MOG (≥1/160)	IgG anti-MOG (ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΚΙΤ)
1	ΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>	ΘΕΤΙΚΟ
2	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
3	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
4	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
5	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
6	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
7	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
8	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
9	ΜΥΕΛΙΤΙΔΑ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
10	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
11	«	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>	ΘΕΤΙΚΟ
12	NMO	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>
13	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
14	«	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>
15	ΕΓΚΕΦΑΛΙΤΙΔΑ	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>	ΘΕΤΙΚΟ
16	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
17	ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
18	«	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>	ΘΕΤΙΚΟ
19	«	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΟ</b>
20	ΣΚΠ/ΜΥΕΛΙΤΙΔΑ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
21	ΣΚΠ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ

Επιπλέον, εξετάσαμε 40 αντι-AQP4 θετικούς ορούς και με τα δύο CBA, δηλαδή το IgG-Fc CBA και το IgG1-CBA, σε αραιώσεις 1/160 και 1/20 αντίστοιχα. Όλοι οι οροί βρέθηκαν αρνητικοί και με τα δύο CBA. Επίσης, ελέγξαμε 25 από τους παραπάνω αρνητικούς μάρτυρες (10 από τους υγιείς μάρτυρες και 15 από τους θετικούς αντι-AQP4 ορούς) με το εμπορικό CBA και όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά.

Τέλος, εξετάσαμε και τους 426 ορούς που παραπέμφθηκαν στις συνεργαζόμενες κλινικές με το IgG-Fc CBA και 144 από αυτά με το εμπορικό CBA. Όλοι οι οροί που ήταν αρνητικοί με το IgG1-CBA, ήταν επίσης αρνητικοί και με τα δύο IgG-CBA. Αντίθετα, μεταξύ των 21 ασθενών που ήταν θετικοί στο IgG1-CBA, 6 ήταν αρνητικοί με το IgG(Fc)-CBA (με τίτλους χαμηλότερους του ορίου θετικότητας, μεταξύ 1/40 και 1/80) και 3 ήταν αρνητικοί με το εμπορικό CBA, 2 από τους οποίους ήταν μεταξύ των 6 αρνητικών από το IgG(Fc)-CBA. Είναι ενδιαφέρον ότι και οι δύο «διπλά αρνητικοί» ασθενείς είχαν τυπική AQP4-οροαρνητική NMO και με ιστορικό ON όσο και με εκτεταμένες βλάβες μυελίτιδας.

## **5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στο πρώτο μέρος της μελέτης αυτής, προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε ένα πολύ ειδικό CBA για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του α3-nAChR και συγκεκριμένα για την νόσο AAG και επιπλέον βασιζόμενοι στην τεχνική αυτή ανιχνεύσαμε αντισώματα έναντι του α4-nAChR σε ασθενείς που ανήκουν στο φάσμα AES.

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων κατά των nAChRs που περιέχουν την α3-υπομονάδα (α3-nAChR/ γαγγλιονικοί nAChRs) για την ορολογική διάγνωση της AAG συνήθως εκτελούνταν με την τεχνική RIPA που αναπτύχθηκε από τους Vernino και συν.<sup>87</sup>, οι οποίοι ανακάλυψαν την παρουσία αντισωμάτων έναντι του α3-nAChR σε ασθενείς με AAG, χρησιμοποιώντας διαλυτοποιημένο α3-nAChR (από εκχυλίσματα κυττάρων που φέρουν α3-nAChR) προεπωασμένο με I<sup>125</sup>-επιβατιδίνη. Η ανάλυση αυτή έφερε επανάσταση στην διάγνωση και κατ'επέκταση στην αντιμετώπιση της AAG<sup>84,88</sup>. Επιπλέον, μία ακόμη ομάδα<sup>99</sup> ανέπτυξε ένα σύστημα ανοσοκατακρήμνισης λουσιφεράσης (LIPS) για την ανίχνευση αντισωμάτων, μεμονωμένα είτε για την α3 ή την β4 υπομονάδα των γαγγλιονικών nAChR<sup>99</sup>.

Αν και η RIPA και δευτερευόντως η LIPS είναι σημαντικά εργαλεία στην διάγνωση της AAG, ωστόσο υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί που πρέπει να αναφερθούν: 1) περίπου στο 50% των εξεταζομένων με χαμηλή συγκέντρωση αντισωμάτων, φαίνεται τα τελευταία να είναι μη ειδικά και να υπάρχουν σε διάφορες νευρολογικές ασθένειες<sup>85,172</sup>, 2) και στις δύο τεχνικές, που χρησιμοποιείται απορρυπαντικό για την διαλυτοποίηση του υποδοχέα ή υπομονάδων αυτού, δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των αντισωμάτων που προσδένονται στους nAChRs της κυτταρικής επιφάνειας (δηλαδή των δυνητικά παθογόνων) και σε αυτά που προσδένονται σε μη προσβάσιμες θέσεις των nAChRs, 3) η RIPA μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε εργαστήρια κατάλληλα για χρήση ραδιενέργειας και 4) τέλος, η LIPS διαδικασία χρησιμοποιεί μεμονωμένες υπομονάδες του nAChR, που πιθανότατα στερούνται αρκετών ανέπαφων επιτόπων.

Την τελευταία δεκαετία έχει αποδειχθεί ότι τα CBA είναι ειδικότερα από άλλες τεχνικές για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων κλινικής σημασίας<sup>165,170,173</sup>. Στα CBA με ζωντανά κύτταρα, τα αντισώματα που ανιχνεύονται, προσδένονται

στους εξωκυτταρικούς επιτόπους των αντιγόνων, σε φυσική διαμόρφωση, αυτά δηλαδή που είναι δυνητικά παθογόνα. Εξαιρώντας την ανίχνευση των μη παθογόνων αντισωμάτων, το CBA αποδεικνύεται πιο ειδικό για την εργαστηριακή διάγνωση συγκεκριμένων ασθενειών. Επιπλέον, στο live CBA, η διαμόρφωση των επιτόπων διατηρείται άθικτη, σε αντίθεση με τα CBA μονιμοποιημένων κυττάρων και άλλες δοκιμασίες, βελτιώνοντας έτσι την ειδικότητα της διαδικασίας. Επομένως, το live CBA, θεωρείται «πρότυπη» δοκιμασία για την ανίχνευση πολλών αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων της κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκονται σε αυτοάνοσα νευρολογικά νοσήματα<sup>174,175</sup>.

Μέχρι πρόσφατα, η ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων CBA για αυτοαντισώματα έναντι των νευρωνικών nAChRs ήταν πολύ δύσκολη καθώς η επιφανειακή έκφραση των υποδοχέων αυτών, ήταν μικρή<sup>176,177</sup>. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες συνοδοί RIC3 και NACHO αλλά και η παρουσία νικοτίνης φαίνεται ότι αυξάνουν την έκφραση ορισμένων υπότυπων nAChRs<sup>176,178,179</sup>. Το ίδιο ισχύει και για τον προσδέτη DFMO στην έκφραση των α4-nAChR<sup>168</sup>. Στην παρούσα διατριβή, εξετάσαμε την επίδραση των τριών παραγόντων (RIC3, NACHO και νικοτίνης) στην έκφραση του α3-nAChR σε επιμολυσμένα κύτταρα HEK293. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι για την καλύτερη έκφραση τους, είναι σημαντικό οι υποδοχείς να είναι «ελεύθεροι» από αλληλουχίες-ετικέτες, όπως myc-flag και GFP, καθώς οι αλληλουχίες αυτές μειώνουν την έκφραση και την έκθεση των υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου. Καταλήξαμε ότι ο συνδυασμός της χρήσης των πρωτεϊνών-συνοδών, της νικοτίνης αλλά και η αφαίρεση αλληλουχιών-ετικέτας, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη πιο ευαίσθητου live CBA. Όμοια, εξετάσαμε την επίδραση των παραγόντων RIC3, NACHO, νικοτίνης και DFMO στην έκφραση των α4-nAChRs.

Το κυριότερο πλεονέκτημα του α3-nAChR CBA που αναπτύξαμε είναι η ειδικότητα του στην εργαστηριακή διάγνωση συγκεκριμένης νόσου. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τις παρούσες δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται σήμερα, περίπου το 50% των ασθενών με χαμηλά επίπεδα α3-nAChR αντισωμάτων, παρουσιάζουν μία ποικιλία διαταραχών εκτός από την AAG, συμπεριλαμβανομένων των POTS<sup>180</sup>, νευροπάθειας μικρών και μεγάλων ινών, εγκεφαλίτιδας, LEMS και παρανεοπλασματικών διαταραχών που σχετίζονται με

το Hu αντιγόνο, άγνωστης κλινικής σημασίας<sup>84,85,87</sup>. Επομένως, η σημασία χαμηλού επιπέδου αντισωμάτων στην RIPA είναι υπό αμφισβήτηση.

Είναι ενδιαφέρον ότι το CBA που αναπτύξαμε είναι ειδικό για την ανίχνευση αντισωμάτων στην AAG. Συγκεκριμένα, και οι 15 ασθενείς με AAG ήταν θετικοί τόσο στην RIPA όσο και στο CBA. Αν και η πλειοψηφία των ασθενών αυτών είχαν μέτριους προς υψηλούς τίτλους αντισωμάτων στην RIPA (δηλ. θεωρούνται ειδικοί για την AAG), ένας ασθενής είχε οριακό τίτλο (0.05nM) και ήταν θετικός στο CBA. Σημαντικό είναι ότι ο ασθενής αυτός είχε περιορισμένα συμπτώματα της AAG, πιθανόν λόγω των χαμηλών τίτλων αντισωμάτων  $\alpha 3$ -nAChR (τόσο στην RIPA όσο και στο CBA), διαπίστωση η οποία συμφωνεί με τους Vernino και συν.<sup>181</sup>, οι οποίοι αναφέρουν ότι ασθενείς με ήπια συμπτώματα AAG, έχουν και μέτριους τίτλους αντισωμάτων. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να καθορίσουν το όριο τίτλου του  $\alpha 3$ -CBA που θα πρέπει να αξιολογείται. Σε αντίθεση, και οι 4 ασθενείς χωρίς AAG και με χαμηλά επίπεδα RIPA (0.05-0.13nM) ήταν CBA αρνητικοί.

Η κυρίαρχη υποτάξη IgG των  $\alpha 3$ -nAChRs αντισωμάτων των CBA-θετικών ασθενών, είναι η IgG1. Τα IgM αντισώματα βρίσκονταν σε μειοψηφία και ανιχνεύθηκαν σε έναν μόνο ασθενή. Επίσης, πειράματα με RIPA με υψηλότιτλους ορούς και αντι-Fc-IgG για την κατακρήμνιση των αντισωμάτων, έδειξε ότι η πλειοψηφία των αντισωμάτων ανήκουν στην κατηγορία των IgGs. Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι κανένας από τους 2680 ορούς-μάρτυρες που ανήκαν σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη ή με υποψία νευροάνοσης ασθένειας δεν βρέθηκε θετικός στο  $\alpha 3$ -CBA. Στα δείγματα αυτά, συμπεριλαμβάνονταν 52 ασθενείς με αντι-VGCC ή αντι-Hu, 6 από τους οποίους βρέθηκαν  $\alpha 3$ -nAChR-RIPA θετικοί αλλά αρνητικοί στο CBA.

Όλοι οι οροί του **πίνακα 3**, ελέγχθηκαν με CBA τόσο για τον  $\alpha 3\beta 4$ - όσο και για τον  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR. Όλοι οι οροί προσδέθηκαν και στους δύο nAChRs, υποδηλώνοντας ότι είχαν αντισώματα για την  $\alpha 3$  υπομονάδα. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι κανένας από τους ορούς δεν προσδέθηκε στον  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, επομένως οποιαδήποτε πρόσδεση στον  $\alpha 3\beta 2$  υποδοχέα, οφείλεται στην  $\alpha 3$  υπομονάδα. Ωστόσο, υπήρξε πολύ σημαντική διαφορά στην αναλογία τίτλου μεταξύ των  $\alpha 3\beta 4$ - και  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs ανάμεσα στους διάφορους ορούς, από 0.8 έως 5 (μέσος όρος 1.9). Η υψηλή αναλογία

των τίτλων α3β4/α3β2 στο CBA (6/15 οροί με αναλογία  $\geq 2$ ), θα μπορούσε να αποδωθεί σε διάφορους πιθανούς λόγους:

1. Μερικοί οροί μπορεί να περιέχουν αντισώματα έναντι της β υπομονάδας, ιδιαίτερα αντι-β4.

2. Αρκετά, κυρίως αντισώματα έναντι της α3, μπορεί να προσδεθούν σε επιτόπους που βρίσκονται σε ενδιάμεσα σημεία μεταξύ των υπομονάδων.

3. Οι δύο διαφορετικές β-υπομονάδες, μπορεί να δημιουργούν διαφορετικές αλλαγές στην διαμόρφωση των α3 επιτόπων.

4. Πιθανόν, η υψηλότερη έκφραση των α3β4 υποδοχέων από τους α3β2<sup>178</sup>, θα μπορούσε να έχει επηρεάσει τους τίτλους στο CBA. Αν και αντισώματα έναντι της β4 υπομονάδας υπάρχουν<sup>99,182</sup>, οι Nakane και συν.<sup>99</sup>, έδειξαν ότι είναι λιγότερα σε σχέση με τα αντισώματα έναντι της α3, κάτι το οποίο δεν μπορεί να δικαιολογήσει την μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των τίτλων α3β4/α3β2 των CBA. Οποιαδήποτε διαφορά στην αποτελεσματικότητα της έκφρασης των δύο nAChRs, αναμένεται να έχει παρόμοια επίδραση στην δέσμευση όλων των ορών.

Για τους παραπάνω λόγους, προτείνουμε ότι οι διαφορές στις ενδιάμεσες φάσεις των υπομονάδων και/ή οι διαφορές στην διαμόρφωση των α3 υπομονάδων ανάμεσα στους δύο υποδοχείς, είναι οι πιο πιθανοί λόγοι για τους διαφορετικούς τίτλους των CBA των δύο υποδοχέων.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι το νέο CBA για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του α3-nAChR, είναι τουλάχιστον εξίσου ευαίσθητη διαδικασία με την RIPA και σε αντίθεση με την RIPA είναι ειδική τεχνική για την AAG νόσο. Επιπλέον, σε αντίθεση με την RIPA, η οποία μπορεί να πραγματοποιείται μόνο σε εργαστήρια κατάλληλα για χρήση ραδιενέργειας, το CBA, ακολουθώντας τις προτεινόμενες συνθήκες για υψηλή έκφραση του υποδοχέα, μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πολλά εργαστήρια παγκοσμίως. Λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών με AAG νόσο, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη μεγαλύτερου αριθμού ασθενών με σκοπό την αξιολόγηση της ακριβούς ειδικότητας και ευαισθησίας της ανάλυσης αυτής για τον καλύτερο προσδιορισμό της AAG ως κλινικής οντότητας.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης αυτής, ασχοληθήκαμε με τα αντισώματα έναντι των α4-nAChRs και τον ρόλο τους στο AES. Είναι γνωστό ότι αντισώματα έναντι συναπτικών υποδοχέων (π.χ NMDA, AMPA, GABA, γλυκίνης), θεωρούνται η κύρια αιτία μιας ευρείας σειράς νευρολογικών διαταραχών με υποξεία έναρξη (<3 μήνες) και βασικά συμπτώματα την επιληψία, ψυχική και ανοϊκή συνδρομή, συνθέτοντας ένα φάσμα εκδηλώσεων χαρακτηριστικό της αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας και συναφών συνδρόμων (AES)<sup>112</sup>. Ωστόσο, πολλοί AES ασθενείς είναι οροαρνητικοί για τα γνωστά αντισώματα, καθιστώντας αναγκαία την ταυτοποίηση νέων αντισωμάτων για την έγκαιρη διάγνωση, σωστή θεραπεία και πρόγνωση. Επιλέξαμε να εστιάσουμε την έρευνα μας στους α4β2-nAChRs, καθώς είναι υποδοχείς σε αφθονία στο ΚΝΣ, παίζοντας κρίσιμους ρόλους στην λειτουργία του εγκεφάλου και αυτό τα καθιστά σημαντικά υποψήφια αυτοαντιγόνα στην εγκεφαλοπάθεια και στο AES.

Κύριος στόχος της μελέτης αυτής ήταν να αναπτύξουμε ένα ευαίσθητο CBA με ζωντανά κύτταρα ώστε να ανιχνεύονται αντισώματα έναντι του α4β2-nAChR, σε «ορφανές» περιπτώσεις AES. Παρουσιάζουμε 3 ασθενείς οι οποίοι βρέθηκαν θετικοί για αντισώματα έναντι του α4β2-nAChR, με το βελτιωμένο CBA που αναπτύξαμε, μετά από έλεγχο 1752 ασθενών, «ύποπτων» για AES.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έκφραση των νευρωνικών nAChRs από κύτταρα θηλαστικών μετά από επαγόμενη επιμόλυνση είναι συνήθως χαμηλή, παρεμποδίζοντας τα απαιτούμενα επίπεδα έκφρασης των μεμβρανικών υποδοχέων. Βασιζόμενοι στην αύξηση της έκφρασης του α3β2-nAChR και στην ανάπτυξη του ευαίσθητου CBA για την ανίχνευση των αντι-α3 nAChR αντισωμάτων, βελτιώσαμε την έκφραση του α4-nAChR με τη συνδυασμένη χρήση των πρωτεϊνών-συνοδών RIC3 και NACHO και της νικοτίνης ή του DFMO. Η νικοτινή, ως φυσικός προσδέτης των nAChRs, αυξάνει την έκφραση τους<sup>39</sup>. Μια πρόσφατη δημοσίευση έδειξε ότι ο προσδέτης DFMO (difluoromethylornithine) ενισχύει τα επίπεδα έκφρασης των α7- και α4β2-nAChRs, αναστέλλοντας τη σύνθεση πολυαμίνης που προκαλείται κανονικά από την ακετυλοτρανσφεράση σπερμίνης (SAT1) και αναστέλλει την έκφραση της α4β2<sup>168</sup>. Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) και οι πολυαμίνες παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κυτταρική αντιγραφή και διαφοροποίηση εντός του εγκεφάλου και επιπλέον, οι πολυαμίνες ρυθμίζουν την λειτουργία των nAChR<sup>169</sup>.

Παρατηρήσαμε ότι η προσθήκη τόσο 1mM νικοτίνης, όσο και 5mM DFMO προκαλούν την ίδια αύξηση έκφρασης (**εικόνα 14**). Μετά από δοκιμές διαφόρων συνδυασμών μοριακών-συνοδών και νικοτίνης ή DFMO, καταλήγουμε πως και για την έκφραση των  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs είναι σημαντική η συνέκφραση των υπομονάδων με RIC3 και NACHO αλλά και η προσθήκη 1mM νικοτίνης ή 5mM DFMO, 24 ώρες μετά την επιμόλυνση.

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο του live CBA, ελέγξαμε για αντι- $\alpha 4\beta 2$  nAChR αντισώματα, 1752 δείγματα ασθενών με «υποψία» AES. Αρχικά ανίχνευσουμε αντι- $\alpha 4\beta 2$  nAChRs αντισώματα σε ασθενή με εγκεφαλίτιδα Rasmussen, ο οποίος ήταν αρνητικός για αντι- $\alpha 3\beta 2$  και αντι- $\alpha 7$  nAChRs αντισώματα. Η πρώτη μελέτη που αποκάλυψε την παρουσία αντισωμάτων έναντι νευρωνικών nAChR σε ασθενείς με εγκεφαλίτιδα Rasmussen, ήταν το 2005 από τους Watson και συν.<sup>58</sup>, οι οποίοι εξέτασαν ορούς από εννέα ασθενείς με ηλεκτροφυσιολογία, τεχνικές απεικόνισης αβεστίου και προσδιορισμούς δέσμευσης προσδέτη. Από την μελέτη αυτή 2 ασθενείς είχαν αυτοαντισώματα κατηγορίας IgG, ειδικά για τον  $\alpha 7$ -nAChR. Επιπλέον, αναφέραμε την παρουσία αντι- $\alpha 4\beta 2$  nAChRs και σε δύο ακόμα ασθενείς, ο ένας με αυτοάνοση μηνιγγοεγκεφαλομυελίτιδα και ο άλλος με πιθανή αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα.

Συμπερασματικά, αναπτύξαμε ευαίσθητο CBA με ζωντανά κύτταρα, για την ανίχνευση των αντι- $\alpha 4\beta 2$  nAChRs αντισωμάτων. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που αποδεικνύει την παρουσία αντισωμάτων έναντι του  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR σε ασθενείς που ανήκουν στο φάσμα AES και δίνει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη μεγαλύτερων ομάδων ασθενών με «υποψία» ή επιβεβαιωμένο AES με στόχο την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό του κλινικού φαινοτύπου. Επιπλέον θα είναι σημαντικό να επαληθευτεί ο ρόλος των αντισωμάτων αυτών στην παθογένεση του AES. Τέλος, μένει να προσδιοριστεί εάν η  $\alpha 4$ -nAChR εγκεφαλίτιδα υπάρχει ως σπάνια κλινική οντότητα για «ορφανές» περιπτώσεις που ανήκουν στο φάσμα AES.

Στο τελευταίο μέρος της μελέτης αυτής, ελέγξαμε τα IgG1 αντι-MOG σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών, τους οποίους υποπτεύονταν οι κλινικοί για «MOG-σύνδρομο» (κατά την περίοδο 2016-2018) και αναλύσαμε τα κλινικά και ακτινολογικά δεδομένα από 21 οροθετικούς ασθενείς (που εντοπίστηκαν μεταξύ

των 426 ασθενών που παραπέμφθηκαν από συνεργαζόμενες κλινικές) που ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα απομυελινωτικών διαταραχών. Επιπλέον, με την σύγκριση των τριών δημοφιλών CBA<sup>153,160,183</sup>, φάνηκε η ανωτερότητα του IgG1-CBA.

Σε προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιούνταν το CBA για την ανίχνευση των ολικών IgG αντισωμάτων<sup>171</sup>, φάνηκε η ύπαρξη υψηλών τίτλων για αντι-MOG, κυρίως σε ασθενείς με ADEM, σε ορισμένους οροαρνητικούς NMO, σε ασθενείς με ON, LETM ή κλινικό μεμονωμένο σύνδρομο. Ωστόσο, τέτοια αντισώματα βρέθηκαν και σε αρκετά δείγματα μαρτύρων<sup>171</sup>. Προφανώς αυτό οφειλόταν στην πιθανότητα το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιούνταν (anti-human IgG H+L), να δημιουργεί διασταυρούμενη αντίδραση και με άλλους υπότυπους ανοσοσφαιρίνης, συμπεριλαμβανομένου και των λιγότερων ειδικών IgM<sup>153</sup>. Για τον λόγο αυτό, ήταν απαραίτητο ένα νέο, βελτιωμένο και ειδικό CBA.

Οι βελτιώσεις στο MOG-CBA αύξησαν την ειδικότητα της ανάλυσης και συνεπώς την χρησιμότητα της για την διάγνωση. Επι του παρόντος, τρία είναι τα επικρατέστερα CBA που χρησιμοποιούνται: 1. ανίχνευση ολικών IgG MOG-αντισωμάτων με CBA ζωντανών κυττάρων<sup>160</sup>, 2. ένα εμπορικό kit στο οποίο τα κύτταρα είναι μονιμοποιημένα και ανιχνεύονται επίσης IgG MOG αντισώματα<sup>183,184</sup> και 3. CBA με ζωντανά κύτταρα όπου ανιχνεύονται επιλεκτικά μόνο τα IgG1 αντι-MOG<sup>153,183</sup>. Διεθνείς μελέτες με χρήση των βελτιωμένων αναλύσεων<sup>163,164,184</sup>, ανίχνευσαν αντισώματα έναντι της MOG κυρίως σε ασθενείς με οπτική νευρίτιδα και ακολούθως σε ασθενείς με μυελίτιδα και εμφάνιση τύπου-ADEM<sup>164</sup>. Με βάση αυτά τα ευρήματα, προτάθηκαν συγκεκριμένα κριτήρια<sup>185</sup>, συστάσεις για δοκιμές<sup>155</sup> και συγκεκριμένα κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά<sup>186</sup>.

Οι 21 οροθετικοί αντι-MOG ασθενείς βρέθηκαν να ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα διαταραχών. Σχεδόν οι μισοί από αυτούς (11/21), διαγνώστηκαν με ON ή μυελίτιδα, με μόνο 3/21 ασθενείς να πληρούν τα κριτήρια για οροαρνητική AQP4-NMOsd<sup>125</sup>. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες, υποδηλώνοντας έτσι ότι οι ασθενείς που ανήκουν στο φάσμα της οροαρνητικής NMOsd, δεν είναι ο πιο κοινός κλινικός φαινότυπος της MOGAD<sup>163,164</sup>. Τρεις ασθενείς που υπέφεραν από εγκεφαλίτιδα και ήταν οροαρνητικοί για άλλα γλοιακά ή νευρωνικά αντιγόνα ή μολυσματικούς παράγοντες, ακολούθησαν πλήρη κλινική και ακτινολογική ανάρρωση. Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν με

πρόσφατες αναφορές που δείχνουν την παρουσία αντι-MOG σε ασθενείς με εγκεφαλίτιδα άγνωστης αιτιολογίας, συχνά με συγκεκριμένα ευρήματα, που χαρακτηρίζονται ως φλοιώδη εγκεφαλίτιδα<sup>186,187</sup>. Δύο ασθενείς χαρακτηρίστηκαν με εγκεφαλομυελίτιδα, με βάση την παρουσία ογκόμορφων βλαβών και εκτεταμένης μυελίτιδας. Ένας από αυτούς είχε επίσης, αντισώματα έναντι του NMDAR, με ιστορικό ψύχωσης, ομοίως με προηγούμενες παρατηρήσεις. Άλλοι τρεις ασθενείς είχαν εγκεφαλικές βλάβες που πληρούσαν τα αναθεωρημένα, από το 2017, κριτήρια για ΣΚΠ<sup>154</sup>. Ωστόσο, άτυπα ευρήματα υποδήλωσαν την παρουσία διαταραχής που σχετίζεται με MOGAD. Τα χαρακτηριστικά της ΣΚΠ<sup>188</sup> ήταν άτυπα και επίσης είχαν ευρήματα που συχνά ανιχνεύονται σε ασθένειες που σχετίζονται με αντισώματα έναντι της MOG<sup>155</sup>. Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές<sup>161</sup>, οι υποτροπές δεν ήταν ασυνήθιστο χαρακτηριστικό στους ασθενείς που ελέγξαμε,  $0.73 \pm 0.82$  ετησίως, με χαμηλότερο ποσοστό υποτροπής στους ασθενείς που είχαν λάβει ανοσοθεραπεία σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν λάβει.

Η χρησιμότητα της σύγκρισης των τριών πιο δημοφιλών MOG-CBA απαιτούνταν, για να καθοριστεί η καταλληλότερη ανάλυση. Σε πρόσφατη εκτενή μελέτη<sup>189</sup>, οροί οι οποίοι βρέθηκαν αντι-MOG θετικοί με ζωντανών κυττάρων IgG-CBA, στην συνέχεια ελέγχθηκαν και με ζωντανών κυττάρων IgG1-CBA αλλά και με μονιμοποιημένων κυττάρων IgG-CBA. Περίπου το 94% ήταν επίσης θετικοί με το IgG1-CBA αλλά η διαδικασία με τα μονιμοποιημένα κύτταρα ήταν λιγότερο ευαίσθητη<sup>189</sup>. Ωστόσο, δεν διερευνήθηκε αν οι τελευταίες δύο διαδικασίες θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν επιπλέον θετικούς ορούς, αρνητικούς με την διαδικασία live-IgG-CBA.

Στην παρούσα έρευνα, ελέγξαμε τους 426 ορούς και με τις τρεις διαδικασίες. Και οι 405 αρνητικοί ασθενείς με το IgG1-CBA, ήταν επίσης αρνητικοί και με τα δύο άλλα CBA. Είναι ενδιαφέρον ότι μεταξύ των 21 οροθετικών ασθενών με το IgG1-CBA, 6/21 είχαν αρνητικό τίτλο με το IgG (Fc)-CBA (κάτω από την αραιώση-όριο που είναι 1/160). Το όριο 1/160 για το IgG (Fc)-CBA, υιοθετήθηκε, όπως προτάθηκε από την αρχική δημοσίευση<sup>171</sup> καθώς και από δικές μας παρατηρήσεις, αφού χαμηλότερες αραιώσεις ορού (1/40-1/80) έδωσαν περιστασιακά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι 6 «οροαρνητικοί» ασθενείς μας με την διαδικασία αυτή (αλλά θετικοί με το IgG1-

CBA), είχαν αξιοσημείωτους τίτλους αντισωμάτων (1/40-1/80), αν και ήταν κάτω από το καθορισμένο όριο και επιπλέον είχαν χαρακτηριστικά ευρήματα της MOGAD. Αυτό υποδηλώνει ότι στο IgG (Fc)-CBA, οι τίτλοι αντισωμάτων κάτω από το cut-off έχουν διφορούμενη σημασία. Δηλαδή, κάποια δείγματα μπορεί να αντιστοιχούν σε πραγματική νόσο MOGAD και ορισμένα σε αρνητικούς, «ψευδώς θετικούς», ορούς. Στο εμπορικό CBA ήταν θετικοί 18/21 ορούς και 3 ήταν αρνητικοί, οι 2 από τους οποίους ήταν αρνητικοί και στο IgG (Fc)-CBA. Στην πραγματικότητα, οι δύο «διπλά οροαρνητικοί» ασθενείς (αρ. 12 και 21) αλλά θετικοί με το IgG1-CBA είχαν τυπική NMO.

Συμπερασματικά, το IgG1-CBA φαίνεται πολύ πιο ευαίσθητη διαδικασία, περισσότερο από τα άλλα δύο CBA. Πράγματι, με το IgG1-CBA ανιχνεύθηκαν 21/426 οροθετικοί ασθενείς, ενώ με τις δύο άλλες αναλύσεις ανιχνεύθηκαν 18/426 (με το IgG (Fc)-CBA) και 15/426 (με το εμπορικό CBA) οροθετικοί (όλοι εντός της ομάδας των 21 οροθετικών από το IgG1-CBA). Επιπλέον, με το IgG1-CBA παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των αντι-MOG και της κατάστασης της νόσου. Για 10/11 ελεγμένες περιπτώσεις, ο τίτλος μειώθηκε μεταξύ της υποτροπής και της ύφεσης, υποδηλώνοντας την δυνατότητα παρακολούθησης της νόσου. Στην πραγματικότητα, 3/4 ασθενείς (αρ. 13, 18 και 21), θετικοί με το IgG1-CBA σε υποτροπή, έγιναν αρνητικοί κατά την ύφεση της νόσου, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την ειδικότητα της δοκιμασίας. Επιπλέον, το IgG1-CBA είναι τουλάχιστον τόσο ειδικό όσο και οι δύο άλλες διαδικασίες, καθώς κανένα από τα 120 δείγματα μάρτυρες δεν βρέθηκαν θετικά με το IgG1-CBA, ενώ αντίθετα ένα δείγμα μάρτυρας βρέθηκε θετικό με το IgG (Fc)-CBA. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το IgG1-CBA είναι πιο ειδικό και πιο ευαίσθητο για την ανίχνευση των αντι-MOG<sup>125,183</sup>. Θεωρούμε ότι χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, με μεγαλύτερο αριθμό κλινικά καθορισμένων ασθενών, η οποία θα υποστηρίξει τα ευρήματά μας και θα καταστήσει το IgG1-CBA ως την «πρότυπη» διαδικασία ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι της MOG. Σημαντικό επίσης είναι να γίνει περαιτέρω καθορισμός των ορίων της διαδικασίας για την κάλυψη του αυξανόμενου φάσματος των MOG διαταραχών.

## **6 Βιβλιογραφία**

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des.* 2006;12(28):3573-81. doi:10.2174/138161206778522056
2. Wess J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol.* 1996;10(1):69-99. doi:10.1615/critrevneurobiol.v10.i1.40
3. Changeux J, Edelstein SJ. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol.* Jun 2001;11(3):369-77. doi:10.1016/s0959-4388(00)00221-x
4. Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol.* Oct 1997;15(2):193-222. doi:10.1007/BF02740634
5. Jones CK, Byun N, Bubser M. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* Jan 2012;37(1):16-42. doi:10.1038/npp.2011.199
6. Carlson AB, Kraus GP. Physiology, Cholinergic Receptors. *StatPearls.* 2023.
7. Grenningloh G, Gundelfinger E, Schmitt B, et al. Glycine vs GABA receptors. *Nature.* Nov 5-11 1987;330(6143):25-6. doi:10.1038/330025b0
8. Karlin A, Akabas MH. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron.* Dec 1995;15(6):1231-44. doi:10.1016/0896-6273(95)90004-7
9. Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* Mar 1995;18(3):121-7. doi:10.1016/0166-2236(95)93887-4
10. Tsunoyama K, Gojobori T. Evolution of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Mol Biol Evol.* May 1998;15(5):518-27. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025951
11. Missias AC, Chu GC, Klocke BJ, Sanes JR, Merlie JP. Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. *Dev Biol.* Oct 10 1996;179(1):223-38. doi:10.1006/dbio.1996.0253
12. Horton RM, Manfredi AA, Conti-Tronconi BM. The 'embryonic' gamma subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is expressed in adult extraocular muscle. *Neurology.* May 1993;43(5):983-6. doi:10.1212/wnl.43.5.983
13. Bouzat C, Bren N, Sine SM. Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron.* Dec 1994;13(6):1395-402. doi:10.1016/0896-6273(94)90424-3
14. Blount P, Merlie JP. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron.* Sep 1989;3(3):349-57. doi:10.1016/0896-6273(89)90259-6
15. Beeson D, Morris A, Vincent A, Newsom-Davis J. The human muscle nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit exist as two isoforms: a novel exon. *EMBO J.* Jul 1990;9(7):2101-6. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07378.x
16. Beeson D, Vincent A, Morris A, et al. cDNA and genomic clones encoding the human muscle acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 21 1993;681:165-7. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb22882.x
17. Noda M, Takahashi H, Tanabe T, et al. Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature.* Apr 7 1983;302(5908):528-32. doi:10.1038/302528a0
18. Conti-Tronconi BM, Hunkapiller MW, Raftery MA. Molecular weight and structural nonequivalence of the mature alpha subunits of Torpedo californica acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1984;81(9):2631-4. doi:10.1073/pnas.81.9.2631
19. McGehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:521-46. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.002513

20. Role LW. Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr Opin Neurobiol.* Jun 1992;2(3):254-62. doi:10.1016/0959-4388(92)90112-x
21. Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell.* Nov 18 1994;79(4):705-15. doi:10.1016/0092-8674(94)90555-x
22. Zoli M, Pistillo F, Gotti C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology.* Sep 2015;96(Pt B):302-11. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.003
23. Lindstrom JM. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve.* Apr 2000;23(4):453-77. doi:10.1002/(sici)1097-4598(200004)23:4<453::aid-mus3>3.0.co;2-o
24. Fucile S. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* Jan 2004;35(1):1-8. doi:10.1016/j.ceca.2003.08.006
25. Dajas-Bailador F, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* Jun 2004;25(6):317-24. doi:10.1016/j.tips.2004.04.006
26. Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol.* Oct 1997;53(2):199-237. doi:10.1016/s0301-0082(97)00034-8
27. Lena C, Changeux JP, Mulle C. Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci.* Jun 1993;13(6):2680-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-06-02680.1993
28. Sher E, Chen Y, Sharples TJ, et al. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(3):283-97. doi:10.2174/1568026043451393
29. Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krosgaard-Larsen P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem.* Jul 28 2005;48(15):4705-45. doi:10.1021/jm040219e
30. Arenella LS, Oliva JM, Jacob MH. Reduced levels of acetylcholine receptor expression in chick ciliary ganglion neurons developing in the absence of innervation. *J Neurosci.* Oct 1993;13(10):4525-37. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-10-04525.1993
31. Devay P, Qu X, Role L. Regulation of nAChR subunit gene expression relative to the development of pre- and postsynaptic projections of embryonic chick sympathetic neurons. *Dev Biol.* Mar 1994;162(1):56-70. doi:10.1006/dbio.1994.1066
32. Alkondon M, Albuquerque EX. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 2004;145:109-20. doi:10.1016/S0079-6123(03)45007-3
33. Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* Sep 2009;8(9):733-50. doi:10.1038/nrd2927
34. Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol.* Dec 2002;53(4):524-34. doi:10.1002/neu.10114
35. Skok M, Grailhe R, Agenes F, Changeux JP. The role of nicotinic acetylcholine receptors in lymphocyte development. *J Neuroimmunol.* Feb 2006;171(1-2):86-98. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.09.011
36. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* May 25 2000;405(6785):458-62. doi:10.1038/35013070
37. Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest.* Aug 2002;110(4):527-36. doi:10.1172/JCI14676

38. Gerzanich V, Peng X, Wang F, et al. Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. Oct 1995;48(4):774-82.
39. Xiu X, Puskar NL, Shanata JA, Lester HA, Dougherty DA. Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation-pi interaction. *Nature*. Mar 26 2009;458(7237):534-7. doi:10.1038/nature07768
40. Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron*. Mar 25 2004;41(6):907-14. doi:10.1016/s0896-6273(04)00115-1
41. Papke RL, Heinemann SF. Partial agonist properties of cytosine on neuronal nicotinic receptors containing the beta 2 subunit. *Mol Pharmacol*. Jan 1994;45(1):142-9.
42. Karlin A, Cox RN, Dipaola M, et al. Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;463:53-69. doi:10.1111/j.1749-6632.1986.tb21503.x
43. Arias HR. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev*. Oct 1997;25(2):133-91. doi:10.1016/s0165-0173(97)00020-9
44. Chiappinelli VA. Kappa-bungarotoxin: a probe for the neuronal nicotinic receptor in the avian ciliary ganglion. *Brain Res*. Oct 24 1983;277(1):9-22. doi:10.1016/0006-8993(83)90902-2
45. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis. III. Patients with low anti-AChR antibody levels. *Clin Exp Immunol*. Jun 1985;60(3):631-6.
46. Fostieri E, Beeson D, Tzartos SJ. The conformation of the main immunogenic region on the alpha-subunit of muscle acetylcholine receptor is affected by neighboring receptor subunits. *FEBS Lett*. Sep 15 2000;481(2):127-30. doi:10.1016/s0014-5793(00)01980-3
47. Roxanis I, Micklem K, Willcox N. True epithelial hyperplasia in the thymus of early-onset myasthenia gravis patients: implications for immunopathogenesis. *J Neuroimmunol*. Jan 1 2001;112(1-2):163-73. doi:10.1016/s0165-5728(00)00415-x
48. Giraud M, Vandiedonck C, Garchon HJ. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:180-92. doi:10.1196/annals.1405.027
49. Phillips LH, 2nd. The epidemiology of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. Sep 2003;998:407-12. doi:10.1196/annals.1254.053
50. Sine SM, Kreienkamp HJ, Bren N, Maeda R, Taylor P. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity. *Neuron*. Jul 1995;15(1):205-11. doi:10.1016/0896-6273(95)90077-2
51. Nakano S, Engel AG. Myasthenia gravis: quantitative immunocytochemical analysis of inflammatory cells and detection of complement membrane attack complex at the end-plate in 30 patients. *Neurology*. Jun 1993;43(6):1167-72. doi:10.1212/wnl.43.6.1167
52. Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, et al. Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 31 1995;92(3):758-62. doi:10.1073/pnas.92.3.758
53. Ohno K, Quiram PA, Milone M, et al. Congenital myasthenic syndromes due to heteroallelic nonsense/missense mutations in the acetylcholine receptor epsilon subunit gene: identification and functional characterization of six new mutations. *Hum Mol Genet*. May 1997;6(5):753-66. doi:10.1093/hmg/6.5.753
54. Engel AG, Ohno K, Milone M, et al. New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet*. Sep 1996;5(9):1217-27. doi:10.1093/hmg/5.9.1217
55. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*. Aug 2008;154(8):1558-71. doi:10.1038/bjp.2008.185

56. Beckmann J, Lips KS. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology*. 2013;92(5-6):286-302. doi:10.1159/000355835
57. Hogg RC, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. Apr 2004;3(2):123-30. doi:10.2174/1568007043482507
58. Watson R, Jepson JE, Bermudez I, et al. Alpha7-acetylcholine receptor antibodies in two patients with Rasmussen encephalitis. *Neurology*. Dec 13 2005;65(11):1802-4. doi:10.1212/01.wnl.0000191566.86977.04
59. Vernino S, Hopkins S, Wang Z. Autonomic ganglia, acetylcholine receptor antibodies, and autoimmune ganglionopathy. *Auton Neurosci*. Mar 12 2009;146(1-2):3-7. doi:10.1016/j.autneu.2008.09.005
60. Quik M, Wonnacott S. alpha6beta2\* and alpha4beta2\* nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease. *Pharmacol Rev*. Dec 2011;63(4):938-66. doi:10.1124/pr.110.003269
61. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. Apr 1997;20(4):154-9. doi:10.1016/s0166-2236(96)01030-2
62. Whitehouse PJ, Martino AM, Wagster MV, et al. Reductions in [3H]nicotinic acetylcholine binding in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: an autoradiographic study. *Neurology*. May 1988;38(5):720-3. doi:10.1212/wnl.38.5.720
63. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:597-613. doi:10.1146/annurev.pa.36.040196.003121
64. Sahakian B, Jones G, Levy R, Gray J, Warburton D. The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type. *Br J Psychiatry*. Jun 1989;154:797-800. doi:10.1192/bjp.154.6.797
65. Arneric SP, Sullivan JP, Briggs CA, et al. (S)-3-methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) isoxazole (ABT 418): a novel cholinergic ligand with cognition-enhancing and anxiolytic activities: I. In vitro characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. Jul 1994;270(1):310-8.
66. Coleman RJ. Current drug therapy for Parkinson's disease. A review. *Drugs Aging*. Mar-Apr 1992;2(2):112-24. doi:10.2165/00002512-199202020-00005
67. Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW. Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology*. Jun 1995;45(6):1041-51. doi:10.1212/wnl.45.6.1041
68. Menzaghi F, Whelan KT, Risbrough VB, Rao TS, Lloyd GK. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Jan 1997;280(1):393-401.
69. Menzaghi F, Whelan KT, Risbrough VB, Rao TS, Lloyd GK. Effects of a novel cholinergic ion channel agonist SIB-1765F on locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Jan 1997;280(1):384-92.
70. Sullivan JP, Donnelly-Roberts D, Briggs CA, et al. ABT-089 [2-methyl-3-(2-(S)-pyrrolidinylmethoxy)pyridine]: I. A potent and selective cholinergic channel modulator with neuroprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther*. Oct 1997;283(1):235-46.
71. Martin RJ, Gwyther LP, Whitehouse PJ. Special care unit research: ethical issues. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1994;8(Suppl. 1):S360-7.
72. Akaike N. Glycine responses in rat CNS neurons studied with gramicidin perforated patch recording. *Jpn J Physiol*. 1994;44 Suppl 2:S113-8.
73. Sacaan AI, Reid RT, Santori EM, et al. Pharmacological characterization of SIB-1765F: a novel cholinergic ion channel agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. Jan 1997;280(1):373-83.
74. Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, Lindstrom J. "Orphan" alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*. Feb 1997;51(2):320-7.
75. Arnold SE, Trojanowski JQ. Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. *Acta Neuropathol*. Sep 1996;92(3):217-31. doi:10.1007/s004010050512

76. Freedman R, Coon H, Myles-Worsley M, et al. Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 21 1997;94(2):587-92. doi:10.1073/pnas.94.2.587
77. Leonard S, Adams C, Breese CR, et al. Nicotinic receptor function in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1996;22(3):431-45. doi:10.1093/schbul/22.3.431
78. Bickford PC, Wear KD. Restoration of sensory gating of auditory evoked response by nicotine in fimbria-fornix lesioned rats. *Brain Res*. Dec 24 1995;705(1-2):235-40. doi:10.1016/0006-8993(95)01157-9
79. McKeon A, Benarroch EE. Autoimmune autonomic disorders. *Handb Clin Neurol*. 2016;133:405-16. doi:10.1016/B978-0-444-63432-0.00022-0
80. de Rojas Leal C, Lage-Sanchez JM, Pinel-Rios J, et al. Paraneoplastic autoimmune autonomic ganglionopathy as the first symptom of bladder cancer: a case report and review of literature. *Neurol Sci*. Aug 2022;43(8):4841-4845. doi:10.1007/s10072-022-06075-y
81. Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, et al. Agonist Selectivity and Ion Permeation in the alpha3beta4 Ganglionic Nicotinic Receptor. *Neuron*. Nov 6 2019;104(3):501-511 e6. doi:10.1016/j.neuron.2019.07.030
82. Klein CM, Vernino S, Lennon VA, et al. The spectrum of autoimmune autonomic neuropathies. *Ann Neurol*. Jun 2003;53(6):752-8. doi:10.1002/ana.10556
83. Muppidi S. Autoimmune autonomic neuropathies: time to look beyond autoimmune autonomic ganglionopathy. *Clin Auton Res*. Feb 2018;28(1):7-8. doi:10.1007/s10286-017-0496-5
84. Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G, Lennon VA. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N Engl J Med*. Sep 21 2000;343(12):847-55. doi:10.1056/NEJM200009213431204
85. McKeon A, Lennon VA, Lachance DH, Fealey RD, Pittock SJ. Ganglionic acetylcholine receptor autoantibody: oncological, neurological, and serological accompaniments. *Arch Neurol*. Jun 2009;66(6):735-41. doi:10.1001/archneurol.2009.78
86. Young RR, Asbury AK, Adams RD, Corbett JL. Pure pan-dysautonomia with recovery. *Trans Am Neurol Assoc*. 1969;94:355-7.
87. Vernino S, Adamski J, Kryzer TJ, Fealey RD, Lennon VA. Neuronal nicotinic ACh receptor antibody in subacute autonomic neuropathy and cancer-related syndromes. *Neurology*. Jun 1998;50(6):1806-13. doi:10.1212/wnl.50.6.1806
88. Vernino S, Lindstrom J, Hopkins S, Wang Z, Low PA, Muscle Study G. Characterization of ganglionic acetylcholine receptor autoantibodies. *J Neuroimmunol*. Jun 15 2008;197(1):63-9. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.03.017
89. Sandroni P, Low PA. Other autonomic neuropathies associated with ganglionic antibody. *Auton Neurosci*. Mar 12 2009;146(1-2):13-7. doi:10.1016/j.autneu.2008.10.022
90. Vernino S, Lennon VA. Autoantibody profiles and neurological correlations of thymoma. *Clin Cancer Res*. Nov 1 2004;10(21):7270-5. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0735
91. Sandroni P, Vernino S, Klein CM, et al. Idiopathic autonomic neuropathy: comparison of cases seropositive and seronegative for ganglionic acetylcholine receptor antibody. *Arch Neurol*. Jan 2004;61(1):44-8. doi:10.1001/archneur.61.1.44
92. Schroeder C, Vernino S, Birkenfeld AL, et al. Plasma exchange for primary autoimmune autonomic failure. *N Engl J Med*. Oct 13 2005;353(15):1585-90. doi:10.1056/NEJMoa051719
93. Gibbons CH, Vernino SA, Freeman R. Combined immunomodulatory therapy in autoimmune autonomic ganglionopathy. *Arch Neurol*. Feb 2008;65(2):213-7. doi:10.1001/archneurol.2007.60
94. Wang Z, Low PA, Jordan J, et al. Autoimmune autonomic ganglionopathy: IgG effects on ganglionic acetylcholine receptor current. *Neurology*. May 29 2007;68(22):1917-21. doi:10.1212/01.wnl.0000263185.30294.61

95. Vernino S, Ermilov LG, Sha L, Szurszewski JH, Low PA, Lennon VA. Passive transfer of autoimmune autonomic neuropathy to mice. *J Neurosci*. Aug 11 2004;24(32):7037-42. doi:10.1523/JNEUROSCI.1485-04.2004
96. Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci*. Sep 2006;27(9):482-91. doi:10.1016/j.tips.2006.07.004
97. Yamakawa M, Mukaino A, Kimura A, et al. Antibodies to the alpha3 subunit of the ganglionic-type nicotinic acetylcholine receptors in patients with autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol*. Dec 15 2020;349:577399. doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577399
98. Kitazaki Y, Ikawa M, Kishitani T, et al. Progressive Encephalomyelitis with Rigidity and Myoclonus (PERM)-like Symptoms Associated with Anti-ganglionic Acetylcholine Receptor Antibodies. *Intern Med*. Jul 15 2021;60(14):2307-2313. doi:10.2169/internalmedicine.6419-20
99. Nakane S, Higuchi O, Koga M, et al. Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and the detection of subunit-specific autoantibodies to the ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118312. doi:10.1371/journal.pone.0118312
100. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*. Dec 2004;74(6):363-96. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006
101. Gallowitsch-Puerta M, Tracey KJ. Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor. *Ann N Y Acad Sci*. Dec 2005;1062:209-19. doi:10.1196/annals.1358.024
102. Noviello CM, Gharpure A, Mukhtasimova N, et al. Structure and gating mechanism of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Cell*. Apr 15 2021;184(8):2121-2134 e13. doi:10.1016/j.cell.2021.02.049
103. Varadkar S, Bien CG, Kruse CA, et al. Rasmussen's encephalitis: clinical features, pathobiology, and treatment advances. *Lancet Neurol*. Feb 2014;13(2):195-205. doi:10.1016/S1474-4422(13)70260-6
104. Chandley MJ, Miller MN, Kwasigroch CN, Wilson TD, Miller BE. Increased antibodies for the alpha7 subunit of the nicotinic receptor in schizophrenia. *Schizophr Res*. Apr 2009;109(1-3):98-101. doi:10.1016/j.schres.2009.01.023
105. Hoffmann C, Stevens J, Zong S, et al. Alpha7 acetylcholine receptor autoantibodies are rare in sera of patients diagnosed with schizophrenia or bipolar disorder. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208412. doi:10.1371/journal.pone.0208412
106. Freedman R, Adams CE, Leonard S. The alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat*. Dec 2000;20(3-4):299-306. doi:10.1016/s0891-0618(00)00109-5
107. Moretti M, Zoli M, George AA, et al. The novel alpha7beta2-nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization. *Mol Pharmacol*. Sep 2014;86(3):306-17. doi:10.1124/mol.114.093377
108. Kalashnyk O, Lykhmus O, Oliinyk O, Komisarenko S, Skok M. alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor-specific antibody stimulates interleukin-6 production in human astrocytes through p38-dependent pathway. *Int Immunopharmacol*. Dec 2014;23(2):475-9. doi:10.1016/j.intimp.2014.09.022
109. Lykhmus O, Voytenko L, Koval L, et al. alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor-specific antibody induces inflammation and amyloid beta42 accumulation in the mouse brain to impair memory. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122706. doi:10.1371/journal.pone.0122706
110. Stoica E, Enulescu O. Deficiency of sympathetic nervous system function in myasthenia. *J Auton Nerv Syst*. Apr 1992;38(1):69-76. doi:10.1016/0165-1838(92)90218-6

111. Balestra B, Moretti M, Longhi R, Mantegazza R, Clementi F, Gotti C. Antibodies against neuronal nicotinic receptor subtypes in neurological disorders. *J Neuroimmunol.* Jan 3 2000;102(1):89-97. doi:10.1016/s0165-5728(99)00145-9
112. Graus F, Titulaer MJ, Balu R, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* Apr 2016;15(4):391-404. doi:10.1016/S1474-4422(15)00401-9
113. Baker SK, Morillo C, Vernino S. Autoimmune autonomic ganglionopathy with late-onset encephalopathy. *Auton Neurosci.* Mar 12 2009;146(1-2):29-32. doi:10.1016/j.autneu.2008.10.016
114. Halder N, Lal G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2021;12:660342. doi:10.3389/fimmu.2021.660342
115. Abu Zeid O, Abdel-Aziz A, Rashed LA, Said ER. Role of the cutaneous extraneuronal cholinergic system in the pathogenesis of psoriasis: a case-control study. *Clin Exp Dermatol.* Jun 2020;45(4):432-437. doi:10.1111/ced.14124
116. Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res.* Feb 2007;39(2):125-35. doi:10.1055/s-2007-961816
117. Nicocia G, Bonanno C, Lupica A, Toscano A, Rodolico C. Myasthenia gravis after etanercept and ustekinumab treatment for psoriatic arthritis: A case report. *Neuromuscul Disord.* Mar 2020;30(3):246-249. doi:10.1016/j.nmd.2020.01.001
118. Murakami M, Terui T. Palmoplantar pustulosis: Current understanding of disease definition and pathomechanism. *J Dermatol Sci.* Apr 2020;98(1):13-19. doi:10.1016/j.jdermsci.2020.03.003
119. Hagforsen E, Michaelsson K, Lundgren E, et al. Women with palmoplantar pustulosis have disturbed calcium homeostasis and a high prevalence of diabetes mellitus and psychiatric disorders: a case-control study. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(3):225-32. doi:10.1080/00015550510026587
120. Brunasso AMG, Massone C. Clinical characteristics, genetics, comorbidities and treatment of palmoplantar pustulosis: A different perspective. *J Dermatol.* Jan 2021;48(1):e47. doi:10.1111/1346-8138.15644
121. Grando SA. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on keratinocyte functions. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(208):429-50. doi:10.1007/978-3-642-23274-9\_18
122. Uberti F, Bardelli C, Morsanuto V, Ghirlanda S, Cochis A, Molinari C. Stimulation of the Nonneuronal Cholinergic System by Highly Diluted Acetylcholine in Keratinocytes. *Cells Tissues Organs.* 2017;203(4):215-230. doi:10.1159/000451023
123. Murakami M, Kaneko T, Nakatsuji T, et al. Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis. *PLoS One.* 2014;9(10):e110677. doi:10.1371/journal.pone.0110677
124. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* Dec 11-17 2004;364(9451):2106-12. doi:10.1016/S0140-6736(04)17551-X
125. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology.* Jul 14 2015;85(2):177-89. doi:10.1212/WNL.0000000000001729
126. Kitley J, Woodhall M, Waters P, et al. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology.* Sep 18 2012;79(12):1273-7. doi:10.1212/WNL.0b013e31826aac4e
127. Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med.* 2012;63:303-16. doi:10.1146/annurev-med-043010-193843
128. Saadoun S, Papadopoulos MC. Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. *Mult Scler.* Nov 2015;21(13):1644-54. doi:10.1177/1352458515571446

129. Chihara N, Aranami T, Sato W, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1 2011;108(9):3701-6. doi:10.1073/pnas.1017385108
130. Fujihara K, Bennett JL, de Seze J, et al. Interleukin-6 in neuromyelitis optica spectrum disorder pathophysiology. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. Sep 3 2020;7(5)doi:10.1212/NXI.0000000000000841
131. Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*. Dec 11 2007;69(24):2221-31. doi:10.1212/01.WNL.0000289761.64862.ce
132. Huda S, Whittam D, Bhojak M, Chamberlain J, Noonan C, Jacob A. Neuromyelitis optica spectrum disorders. *Clin Med (Lond)*. Mar 2019;19(2):169-176. doi:10.7861/clinmedicine.19-2-169
133. Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med*. Oct 27 2008;205(11):2473-81. doi:10.1084/jem.20081241
134. Pittock SJ, Lucchinetti CF. Neuromyelitis optica and the evolving spectrum of autoimmune aquaporin-4 channelopathies: a decade later. *Ann N Y Acad Sci*. Feb 2016;1366(1):20-39. doi:10.1111/nyas.12794
135. Mealy MA, Kessler RA, Rimler Z, et al. Mortality in neuromyelitis optica is strongly associated with African ancestry. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. Jul 2018;5(4):e468. doi:10.1212/NXI.0000000000000468
136. Pandit L, Asgari N, Apiwattanakul M, et al. Demographic and clinical features of neuromyelitis optica: A review. *Mult Scler*. Jun 2015;21(7):845-53. doi:10.1177/1352458515572406
137. Quek AM, McKeon A, Lennon VA, et al. Effects of age and sex on aquaporin-4 autoimmunity. *Arch Neurol*. Aug 2012;69(8):1039-43. doi:10.1001/archneurol.2012.249
138. Bove R, Elson L, Alvarez E, et al. Female hormonal exposures and neuromyelitis optica symptom onset in a multicenter study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. May 2017;4(3):e339. doi:10.1212/NXI.0000000000000339
139. Estrada K, Whelan CW, Zhao F, et al. A whole-genome sequence study identifies genetic risk factors for neuromyelitis optica. *Nat Commun*. May 16 2018;9(1):1929. doi:10.1038/s41467-018-04332-3
140. Jacob S, Zarei M, Kenton A, Allroggen H. Gluten sensitivity and neuromyelitis optica: two case reports. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Jul 2005;76(7):1028-30. doi:10.1136/jnnp.2004.055491
141. Leite MI, Coutinho E, Lana-Peixoto M, et al. Myasthenia gravis and neuromyelitis optica spectrum disorder: a multicenter study of 16 patients. *Neurology*. May 15 2012;78(20):1601-7. doi:10.1212/WNL.0b013e31825644ff
142. Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation*. Jan 19 2012;9:14. doi:10.1186/1742-2094-9-14
143. Schluesener HJ, Sobel RA, Lington C, Weiner HL. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*. Dec 15 1987;139(12):4016-21.
144. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. Feb 1997;75(2):77-88. doi:10.1007/s001090050092
145. Johns TG, Bernard CC. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem*. Jan 1999;72(1):1-9. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0720001.x
146. Lington C, Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to

- the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol*. Dec 1987;17(1):61-9. doi:10.1016/0165-5728(87)90031-2
147. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol*. Mar 1988;130(3):443-54.
148. Karni A, Bakimer-Kleiner R, Abramsky O, Ben-Nun A. Elevated levels of antibody to myelin oligodendrocyte glycoprotein is not specific for patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. Mar 1999;56(3):311-5. doi:10.1001/archneur.56.3.311
149. Tomassini V, De Giglio L, Reindl M, et al. Anti-myelin antibodies predict the clinical outcome after a first episode suggestive of MS. *Mult Scler*. Nov 2007;13(9):1086-94. doi:10.1177/1352458507077622
150. Pittock SJ, Reindl M, Achenbach S, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pathologically proven multiple sclerosis: frequency, stability and clinicopathologic correlations. *Mult Scler*. Jan 2007;13(1):7-16. doi:10.1177/1352458506072189
151. Perez CA, Agyei P, Gogia B, Harrison R, Samudralwar R. Overlapping autoimmune syndrome: A case of concomitant anti-NMDAR encephalitis and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibody disease. *J Neuroimmunol*. Feb 15 2020;339:577124. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.577124
152. Tanaka M, Tanaka K. Anti-MOG antibodies in adult patients with demyelinating disorders of the central nervous system. *J Neuroimmunol*. May 15 2014;270(1-2):98-9. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.03.001
153. Waters P, Woodhall M, O'Connor KC, et al. MOG cell-based assay detects non-MS patients with inflammatory neurologic disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. Jun 2015;2(3):e89. doi:10.1212/NXI.0000000000000089
154. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. Feb 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
155. Jarius S, Paul F, Aktas O, et al. MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing. *J Neuroinflammation*. May 3 2018;15(1):134. doi:10.1186/s12974-018-1144-2
156. Hacoen Y, Mankad K, Chong WK, et al. Diagnostic algorithm for relapsing acquired demyelinating syndromes in children. *Neurology*. Jul 18 2017;89(3):269-278. doi:10.1212/WNL.0000000000004117
157. Mariotto S, Ferrari S, Monaco S, et al. Clinical spectrum and IgG subclass analysis of anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated syndromes: a multicenter study. *J Neurol*. Dec 2017;264(12):2420-2430. doi:10.1007/s00415-017-8635-4
158. Kezuka T, Ishikawa H. Diagnosis and treatment of anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody positive optic neuritis. *Jpn J Ophthalmol*. Mar 2018;62(2):101-108. doi:10.1007/s10384-018-0561-1
159. Hennes EM, Baumann M, Schanda K, et al. Prognostic relevance of MOG antibodies in children with an acquired demyelinating syndrome. *Neurology*. Aug 29 2017;89(9):900-908. doi:10.1212/WNL.0000000000004312
160. Cobo-Calvo A, Ruiz A, D'Indy H, et al. MOG antibody-related disorders: common features and uncommon presentations. *J Neurol*. Sep 2017;264(9):1945-1955. doi:10.1007/s00415-017-8583-z
161. Ramanathan S, Mohammad S, Tantsis E, et al. Clinical course, therapeutic responses and outcomes in relapsing MOG antibody-associated demyelination. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Feb 2018;89(2):127-137. doi:10.1136/jnnp-2017-316880

162. Ramanathan S, Prelog K, Barnes EH, et al. Radiological differentiation of optic neuritis with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies, aquaporin-4 antibodies, and multiple sclerosis. *Mult Scler*. Apr 2016;22(4):470-82. doi:10.1177/1352458515593406
163. Cobo-Calvo A, Ruiz A, Maillart E, et al. Clinical spectrum and prognostic value of CNS MOG autoimmunity in adults: The MOGADOR study. *Neurology*. May 22 2018;90(21):e1858-e1869. doi:10.1212/WNL.0000000000005560
164. Jurynczyk M, Messina S, Woodhall MR, et al. Clinical presentation and prognosis in MOG-antibody disease: a UK study. *Brain*. Dec 1 2017;140(12):3128-3138. doi:10.1093/brain/awx276
165. Leite MI, Jacob S, Viegas S, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*. Jul 2008;131(Pt 7):1940-52. doi:10.1093/brain/awn092
166. Karagiorgou K, Dandoulaki M, Mantegazza R, et al. Novel Cell-Based Assay for Alpha-3 Nicotinic Receptor Antibodies Detects Antibodies Exclusively in Autoimmune Autonomic Ganglionopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. May 2022;9(3)doi:10.1212/NXI.0000000000001162
167. Marignier R, Bernard-Valnet R, Giraudon P, et al. Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology*. Jun 11 2013;80(24):2194-200. doi:10.1212/WNL.0b013e318296e917
168. Dhara M, Matta JA, Lei M, et al. Polyamine regulation of ion channel assembly and implications for nicotinic acetylcholine receptor pharmacology. *Nat Commun*. Jun 3 2020;11(1):2799. doi:10.1038/s41467-020-16629-3
169. Slotkin TA, Freibaum BD, Tate CA, et al. Long-lasting CNS effects of a short-term chemical knockout of ornithine decarboxylase during development: nicotinic cholinergic receptor upregulation and subtle macromolecular changes in adulthood. *Brain Res*. Aug 15 2003;981(1-2):118-25. doi:10.1016/s0006-8993(03)02993-7
170. Tzartos JS, Karagiorgou K, Tzanetakos D, et al. Deciphering anti-MOG IgG antibodies: Clinical and radiological spectrum, and comparison of antibody detection assays. *J Neurol Sci*. Mar 15 2020;410:116673. doi:10.1016/j.jns.2020.116673
171. Mader S, Gredler V, Schanda K, et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation*. Dec 28 2011;8:184. doi:10.1186/1742-2094-8-184
172. Li Y, Jammoul A, Mente K, et al. Clinical experience of seropositive ganglionic acetylcholine receptor antibody in a tertiary neurology referral center. *Muscle Nerve*. Sep 2015;52(3):386-91. doi:10.1002/mus.24559
173. Waters PJ, McKeon A, Leite MI, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*. Feb 28 2012;78(9):665-71; discussion 669. doi:10.1212/WNL.0b013e318248dec1
174. Yeh EA, Nakashima I. Live-cell based assays are the gold standard for anti-MOG-Ab testing. *Neurology*. Mar 12 2019;92(11):501-502. doi:10.1212/WNL.0000000000007077
175. Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol*. Feb 2019;15(2):89-102. doi:10.1038/s41582-018-0112-x
176. Gu S, Matta JA, Lord B, et al. Brain alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron*. Mar 2 2016;89(5):948-55. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.018
177. Kobayashi S, Yokoyama S, Maruta T, et al. Autoantibody-induced internalization of nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit exogenously expressed in human embryonic kidney cells. *J Neuroimmunol*. Apr 15 2013;257(1-2):102-6. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.12.010
178. Matta JA, Gu S, Davini WB, et al. NACHO Mediates Nicotinic Acetylcholine Receptor Function throughout the Brain. *Cell Rep*. Apr 25 2017;19(4):688-696. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.008

179. Papke RL, Lindstrom JM. Nicotinic acetylcholine receptors: Conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology*. May 15 2020;168:108021. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108021
180. Bryarly M, Raj SR, Phillips L, et al. Ganglionic Acetylcholine Receptor Antibodies in Postural Tachycardia Syndrome. *Neurol Clin Pract*. Aug 2021;11(4):e397-e401. doi:10.1212/CPJ.0000000000001047
181. Vernino S. Autoimmune Autonomic Disorders. *Continuum (Minneap Minn)*. Feb 2020;26(1):44-57. doi:10.1212/CON.0000000000000812
182. Nakane S, Mukaino A, Higuchi O, et al. Autoimmune autonomic ganglionopathy: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. Dec 2018;18(12):953-965. doi:10.1080/14737175.2018.1540304
183. Waters PJ, Komorowski L, Woodhall M, et al. A multicenter comparison of MOG-IgG cell-based assays. *Neurology*. Mar 12 2019;92(11):e1250-e1255. doi:10.1212/WNL.0000000000007096
184. Jarius S, Ruprecht K, Kleiter I, et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin. *J Neuroinflammation*. Sep 26 2016;13(1):279. doi:10.1186/s12974-016-0717-1
185. Lopez-Chiriboga AS, Majed M, Fryer J, et al. Association of MOG-IgG Serostatus With Relapse After Acute Disseminated Encephalomyelitis and Proposed Diagnostic Criteria for MOG-IgG-Associated Disorders. *JAMA Neurol*. Nov 1 2018;75(11):1355-1363. doi:10.1001/jamaneurol.2018.1814
186. Ogawa R, Nakashima I, Takahashi T, et al. MOG antibody-positive, benign, unilateral, cerebral cortical encephalitis with epilepsy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. Mar 2017;4(2):e322. doi:10.1212/NXI.0000000000000322
187. Wang L, Zhang Bao J, Zhou L, et al. Encephalitis is an important clinical component of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody associated demyelination: a single-center cohort study in Shanghai, China. *Eur J Neurol*. Jan 2019;26(1):168-174. doi:10.1111/ene.13790
188. Spadaro M, Gerdes LA, Krumbholz M, et al. Autoantibodies to MOG in a distinct subgroup of adult multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. Oct 2016;3(5):e257. doi:10.1212/NXI.0000000000000257
189. Tea F, Lopez JA, Ramanathan S, et al. Characterization of the human myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody response in demyelination. *Acta Neuropathol Commun*. Sep 3 2019;7(1):145. doi:10.1186/s40478-019-0786-3

## 7 ABSTRACT

Autoimmune neurological diseases are rare diseases with great heterogeneity in the clinical phenotype of patients. The use of specific biomarkers is an important tool for their diagnosis. Among the most well-studied autoimmune disorders are those induced by autoantibodies. Autoantibodies have a pathogenic role mainly when they target cell-membrane antigens such as acetylcholine receptor and MOG-glycoprotein. The present study aims to develop and use improved techniques to detect potentially pathogenic antibodies against  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  neuronal nAChR and MOG glycoprotein, specific for autoimmune neurological diseases such as autoimmune autonomic ganglionopathy (AAG), autoimmune encephalitis (AES) and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease (MOGAD). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are distinguished in many subtypes and are involved in many functions such as memory, learning, movement control and analgesia. Their loss or dysfunction is associated with many neurological and neuropsychiatric diseases. Antibodies against  $\alpha 3$ -nAChR may have pathogenic properties which cause synaptic transmission alteration in sympathetic, parasympathetic and enteric ganglia. Such antibodies have been found in patients with AAG, however low levels of antibodies against  $\alpha 3$ -nAChRs have been detected in various neurological diseases with unknown clinical and therapeutic implications. The use of the radioimmunoprecipitation assay (RIPA) is the method widely used to diagnose AAG, however its specificity is limited as approximately 50% of patients with low levels of  $\alpha 3$ -nAChR antibodies present a variety of disorders other than AAG. For this reason, we developed a cell-based assay (CBA) which specifically detects only pathogenic antibodies of AAG. The use of NACHO and RIC3 chaperones, the removal of tag sequences from the receptors (myc flag and GFP) as well as the addition of nicotine, helped to increase the expression of  $\alpha 3$ -nAChR. We studied sera from 55 patients from Greece, suspected for autonomic failure, and 13 patients from Italy, diagnosed

with autonomic failure and positive for anti- $\alpha 3$  by RIPA. In addition, sera from 52 patients with  $Ca^{2+}$  channel or Hu antibodies and from 2,628 controls with various neuroimmune diseases were included. Of the 25 patients positive for anti- $\alpha 3$  by RIPA, 15 were positive by the CBA we developed and are also clinically confirmed to belong to AAG, while the rest had other neurological diseases. In addition, antibodies against  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR are candidate autoantigens in autoimmune encephalopathy syndrome (AES), a spectrum of neurological diseases characterized by rapid onset of mental confusion, cognitive impairment, seizures, and psychiatric symptoms. Based on the  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR CBA, we improved the detection method of potentially pathogenic  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR antibodies to identify autoantibodies in "orphan" AES cases. The study involved the screening of sera from 1752 sera of patients from Greece, Turkey and Italy who requested testing for AES and 1203 sera of 'control' patients with other neuropsychiatric diseases. 3 patients tested positive for antibodies against  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. The specific clinical features of the 3 positive patients coincided with the spectrum of AES

Furthermore, in the second part of this study, we interested in MOGAD. MOGAD is an inflammatory demyelinating condition in which anti-MOG testing is an important tool in the laboratory diagnosis of the disease. However, because anti-MOG are also detected in other demyelinating diseases, it is important to have an improved CBA to avoid false-positive and false-negative results. Investigating the clinical and radiological spectrum of 21 patients positive for IgG1 anti-MOG, identified in a Greek cohort of 426 patients, "suspected" of MOGAD, and comparing the three most commonly used CBAs for the detection of anti-MOG (live IgG-CBA, live IgG1-CBA and commercial CBA), we concluded that live IgG1-CBA is superior in specificity over the others. The 21 MOG-positive patients were characterized in depth and had the clinical and radiological features associated with MOGAD.

## **8 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

# Novel Cell-Based Assay for Alpha-3 Nicotinic Receptor Antibodies Detects Antibodies Exclusively in Autoimmune Autonomic Ganglionopathy

Katerina Karagiorgou, MSc,\* Maria Dandoulaki, PhD,\* Renato Mantegazza, MD, Francesca Andreetta, PhD, Raffaello Furlan, MD, Jon Lindstrom, PhD, Paraskevi Zisimopoulou, PhD, Elisabeth Chroni, MD, PhD, Panagiotis Kokotis, MD, PhD, Evangelos Anagnostou, MD, PhD, Dimitrios Tzanetakos, MD, Marianthi Breza, MD, Zoe Katsarou, MD, PhD, Georgios Amoiridis, MD, PhD, Vasileios Mastorodemos, MD, PhD, Marianna Bregianni, MD, PhD, Anastasios Bonakis, MD, PhD, Georgios Tsivgoulis, MD, PhD, Konstantinos Voumvourakis, MD, PhD, Socrates Tzartos, PhD, and John Tzartos, MD, PhD

## Correspondence

Dr. John Tzartos  
jtzartos@gmail.com

*Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022;9:e1162. doi:10.1212/NXI.0000000000001162

## Abstract

### Background and Objectives

Autoantibodies against  $\alpha 3$ -subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors ( $\alpha 3$ -nAChRs), usually measured by radioimmunoprecipitation assay (RIPA), are detected in patients with autoimmune autonomic ganglionopathy (AAG). However, low  $\alpha 3$ -nAChR antibody levels are frequently detected in other neurologic diseases with questionable significance. Our objective was to develop a method for the selective detection of the potentially pathogenic  $\alpha 3$ -nAChR antibodies, seemingly present only in patients with AAG.

### Methods

The study involved sera from 55 patients from Greece, suspected for autonomic failure, and 13 patients from Italy diagnosed with autonomic failure, positive for  $\alpha 3$ -nAChR antibodies by RIPA. In addition, sera from 52 patients with  $Ca^{2+}$  channel or Hu antibodies and from 2,628 controls with various neuroimmune diseases were included. A sensitive live cell-based assay (CBA) with  $\alpha 3$ -nAChR-transfected cells was developed to detect antibodies against the cell-exposed  $\alpha 3$ -nAChR domain.

### Results

Twenty-five patients were found  $\alpha 3$ -nAChR antibody positive by RIPA. Fifteen of 25 patients were also CBA positive. Of interest, all 15 CBA-positive patients had AAG, whereas all 10 CBA-negative patients had other neurologic diseases. RIPA antibody levels of the CBA-negative sera were low, although our CBA could detect dilutions of AAG sera corresponding to equally low RIPA antibody levels. No serum bound to control-transfected cells, and none of the 2,628 controls was  $\alpha 3$ -CBA positive.

### Discussion

This study showed that in contrast to the established RIPA for  $\alpha 3$ -nAChR antibodies, which at low levels is of moderate disease specificity, our CBA seems AAG specific, while at least equally sensitive with the RIPA. This study provides Class II evidence that  $\alpha 3$ -nAChR CBA is a specific assay for AAG.

\*These authors contributed equally to the study (co-first authors).

From the Tzartos NeuroDiagnostics (K.K., M.D., S.T., J.T.), Athens; Department of Biochemistry and Biotechnology (K.K.), University of Thessaly, Larissa, Greece; Neuroimmunology and Neuromuscular Diseases Unit (R.M., F.A.), Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy; Department of Biomedical Sciences Humanitas University (R.F.), Milan, Italy; Department of Neuroscience (J.L.), Medical School, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA; Department of Neurobiology (P.Z., S.T.), Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece; Department of Neurology (E.C.), School of Medicine, University of Patras; 1st Department of Neurology (P.K., E.A., D.T., M. Breza), School of Medicine, Eginition Hospital, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens; Department of Neurology (Z.K.), Hippokration Hospital, Thessaloniki; Neurology Department (G.A., V.M.), University Hospital of Crete, Heraklion, Crete; and 2nd Department of Neurology (M. Bregianni, A.B., G.T., K.V., J.T.), Attikon University Hospital, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece.

Go to [Neurology.org/NN](https://www.neurology.org/NN) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

## MORE ONLINE

### Class of Evidence

Criteria for rating therapeutic and diagnostic studies

[NPub.org/coe](https://www.npub.org/coe)

## Glossary

**AAG** = autoimmune autonomic ganglionopathy; **AQP4** = aquaporin-4; **CBA** = cell-based assay; **DMEM** = Dulbecco's modified Eagle's medium; **HEPES** = 0.46% w/v N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid); **LIPS** = luciferase immunoprecipitation system; **mAb** = monoclonal antibody; **nAChR** = nicotinic acetylcholine receptor; **POTS** = postural orthostatic tachycardia syndrome; **RIPA** = radioimmunoprecipitation assay; **RT** = room temperature; **VGCC** = voltage-gated Ca<sup>++</sup> channels P/Q-type;  **$\alpha$ 3-nAChR** =  $\alpha$ 3-subunit-containing nAChR.

## Classification of Evidence

This study provides Class II evidence that an  $\alpha$ 3-nAChR cell-based assay is a more specific assay for AAG than the standard RIPA.

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are a group of pentameric ligand-gated cationic channels formed by 5 subunits, selected among 12 different subunits ( $\alpha$ 2- $\alpha$ 10,  $\beta$ 2- $\beta$ 4).<sup>1</sup> Neuronal nAChRs are ubiquitously expressed in the CNS and peripheral nervous system<sup>2,3</sup> modulating neurotransmitter release or mediating postsynaptic neurotransmission. nAChR dysfunction has been described in several neurologic diseases, including Parkinson disease, Alzheimer disease, autism, and schizophrenia.<sup>4</sup> In the peripheral nervous system, nAChRs are linked to autoimmunity, specifically autoimmune autonomic ganglionopathy (AAG), with antibodies against  $\alpha$ 3-subunit-containing nAChRs ( $\alpha$ 3-nAChRs).<sup>5-7</sup>

Several studies indicate that  $\alpha$ 3-nAChR antibodies may have pathogenic properties resulting in deterioration of synaptic transmission at the sympathetic, parasympathetic, and enteric ganglia.<sup>6,8,9</sup> Such antibodies have been found in patients with AAG characterized by autonomic failure, with main clinical features: orthostatic hypotension, xerostomia, impaired pupil responses, urinary retention, anhidrosis, and gastrointestinal dysmotility.<sup>5</sup> However, low levels of  $\alpha$ 3-nAChR antibodies have been detected in various neurologic diseases<sup>5,10-12</sup> of unknown clinical and therapeutic implications.

The currently established diagnostic method for  $\alpha$ 3-nAChRs antibodies is a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) with <sup>125</sup>I-epibatidine-labeled  $\alpha$ 3-nAChR. Although this method is widely used for AAG diagnosis, low antibody levels have low specificity for AAG (~50%), frequently identified in postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS), encephalopathy, or other neurologic syndromes, where the role of these antibodies has not been justified.<sup>11-13</sup> Therefore, there is a need for the development of an assay that detects only disease-specific  $\alpha$ 3-nAChR antibodies and yet with high sensitivity. Cell-based assay (CBA) is the gold standard method for the detection of potentially pathogenic antibodies against neuronal and glial antigens, usually with high disease specificity.<sup>14-16</sup>

Expression of neuronal nAChRs by transfected cells is usually low, prohibiting the required high sensitivity of the corresponding

CBAs. The chaperons RIC3 and NACHO and the ligand nicotine increase expression of some nAChR subtypes.<sup>17-19</sup> Here, we optimized  $\alpha$ 3-nAChR expression and therefore the assay's sensitivity by the combined use of the 2 chaperons and nicotine. With this CBA, we studied sera of patients from a broad spectrum of neurologic diseases. Of interest, we found that, contrary to RIPA, our CBA was totally AAG specific, without compromising the high RIPA sensitivity.

In this study, we aimed to overcome the low disease specificity of the current diagnostic assays for  $\alpha$ 3-nAChR antibodies at the low titer range. To do this, we developed an assay (a CBA), which detects only antibodies to cell-exposed epitopes of the antigen (i.e., the potentially pathogenic antibodies).

## Methods

### Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

This study was approved by the IRBs of the Attikon University Hospital and the Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta. Patients signed informed consents, approved by the ethics committees.

### Patients, Sera, and mAbs

We screened sera from 2 patient groups: (1) patients with neuroimmune diseases referred to Tzartos NeuroDiagnostics (Athens) between January 2017 and August 2020; of them, 55 were referred for  $\alpha$ 3-nAChR antibody testing, 52 were positive for antibodies to voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels P/Q-type (VGCC) or Hu antigen, and 2,628 patients were referred for antibodies relevant to autoimmune encephalitis, paraneoplastic syndromes, neuromyelitis optica, autoimmune peripheral neuropathies, and myasthenia gravis; and (2) 13 RIPA-positive patients with autonomic failure, identified in the Neurology Department, Carlo Besta Institute, Milan, and the Syncope and Orthostatic Disorders Unit Clinica Medica, Humanitas Research Hospital, Rozzano, Italy. Subunit-specific mAb-295 (anti- $\beta$ 2) and mAb-299 (anti- $\alpha$ 4) were provided by J. Lindstrom.<sup>20</sup>

## Population Sample and Clinical Features of Patients With AAG

We studied 15 patients with AAG with a typical hemodynamic profile characterized by remarkable orthostatic hypotension without any reflex increases in heart rate. The amount of orthostatic hypotension spanned between  $-30$  and  $-60$  mm Hg, depending on the magnitude of the supine hypertension. Additional autonomic symptoms were present, including impaired pupil response to light, early satiety and significant constipation, sweat loss, dry mouth and eyes, and bladder and erectile dysfunctions in the patients with AAG. Notably, erectile dysfunction was the earliest presenting symptom in almost all male patients, and most patients had at least 1 syncope episode on standing up during the 12 months preceding the study enrollment. Most patients also complained for interrupted, troubled, and unrestful sleep; however, no EEG recordings were performed.

Diabetes, autoimmune diseases, and other causes potentially causing dysautonomia were excluded on the basis of clinical examination, appropriate blood test, electrophysiologic testing, and brain MRI. Amyloidosis was excluded with biopsy of periumbilical fat in 3 patients.

In terms of response to immunosuppressive therapies, we obtained clinical data from 9 patients. Specifically, these patients were treated with plasma exchange (5 patients), IV immunoglobulins (2 patients), azathioprine followed by mycophenolate mofetil (1 patient), and/or corticosteroids (5 patients). As previously reported for patients with AAG,<sup>21,22</sup> response to immunotherapies for these 9 patients significantly improved autonomic function, with most prominent the achievement of orthostatic tolerance.

## Radioimmunoprecipitation Assay

RIPA was performed with  $^{125}\text{I}$ -epibatidine-labeled extracts of HEK293 cells transfected with  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR. Cells were solubilized with 0.5% Triton/PBS for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . Cell supernatant was incubated with  $^{125}\text{I}$ -epibatidine for 1 hour at room temperature (RT). Indirectly  $^{125}\text{I}$ -labeled  $\alpha 3$ -nAChR ( $\sim 10,000$  cpm/reaction) was incubated with the patient's serum for 2 hours at RT and subsequently overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Then, goat anti-human IgG (H + L) (RSR Ltd, Cardiff; product number RBA/Ig100) was added and incubated for 1.5 hours at  $4^\circ\text{C}$ . One milliliter buffer was added, centrifuged, pellets washed and their radioactivity was counted in a  $\gamma$ -counter. The cutoff for positivity was 0.05 nM (average of the values of 20 healthy controls + 4 SD). All sera tested by RIPA were previously tested either in Euro Diagnostica, Sweden (Athens sera) or in Carlo Besta (Milan sera) with  $^{125}\text{I}$ -epibatidine-labeled IMR32 extracts. All positive sera by the later systems were also positive by the recombinant  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR, with occasional differences in antibody levels. These differences may be due to differences in the specific activity of  $^{125}\text{I}$ -epibatidine used, the amount of antigen in the reaction, and/or to nAChR heterogeneity in the IMR32 cell extracts.

## Cell Culture and Transfection

HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Various parameters were tested in preliminary experiments to identify the best conditions. The final selected conditions were as follows: cells were seeded on culture dishes and transiently transfected with a mixture of plasmids pCMV6-XL4-CHRNA3 or pCMV6-XL5-CHRNA4, pCMV6-XL5-CHRNB4 or pCMV6-XL5-CHRNB2, pCMV6-XL5-TMEM35 (NACHO), and pCMV6-XL5-RIC3 (OriGene, Herford, Germany); 3.7  $\mu\text{g}$ /plasmid for  $\alpha 3\beta 4$  or  $\alpha 3\beta 2$  and 2.5  $\mu\text{g}$  for  $\alpha 4\beta 2$  per 100 mm culture dish; or control vector, using jet-PRIME kit transfection reagent (Polyplus jetPRIME, France). Cells were treated with 1 mM nicotine (N3876, Sigma), 24 hours before analysis. Cells were washed to remove nicotine before incubation with the test sera.

## Development of a Novel Cell-Based Assay

All sera were screened using the live CBA with HEK293 cells expressing the  $\alpha 3\beta 4$ - or  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR. Forty-eight hours post-transfection, cells were washed with DMEM/0.46% w/v N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) buffer (DMEM-HEPES) in principle as described.<sup>23,24</sup>

CBA involved incubation of serum (1/10 dilution in 1% bovine serum albumin in DMEM-HEPES buffer) with transfected cells. After 1 hour, cells were washed 3 times with DMEM-HEPES buffer and fixed immediately with 4% paraformaldehyde for 10 minutes. Fixed cells incubated with rabbit anti-human IgG (Invitrogen) at 1/750 dilution for 1 hour, followed by incubation with Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit IgG (H + L) (Invitrogen), as the third antibody, at 1/750 dilution for 1 hour (all at RT). The use of the third antibody increased signal, without increasing background, and therefore, it increased sensitivity. Microscopy was performed under blinded conditions by 2 or 3 independent observers. The Olympus microscope CKX-41 was used, and images were analyzed using Infinity Analyze-6.5 Lumenera software. As negative controls, AQP4-transfected HEK293 cells were used. Positive sera were subsequently tested at serial dilutions to determine their titer, expressed as the highest positive dilution. All positive sera were also tested with HEK293 cells transfected with  $\alpha 4\beta 2$ - and  $\alpha 7$ -nAChRs.

Colocalization of serum  $\alpha 3$ -nAChR antibody with the rat anti- $\beta 2$  mAb295 was tested by their coincubation with  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR-expressing cells, fixation as above, followed by incubation with rabbit anti-human IgG (Invitrogen) at 1/750 dilution for 1 hour, followed by simultaneous incubation with Alexa Fluor-488 goat anti-rat IgG (Invitrogen) (1/200 dilution), and Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) (1/750 dilution). Cell incubation with only mAb or serum, followed by incubation with only the anti-antibodies to IgG of the heterologous species, showed no background binding.

The fluorescent signal of a CBA-positive serum antibodies was also counterstained with Hoechst 33258 (40044 Biotium) for cell nucleus staining; Hoechst dye at 1/40000 dilution was

**Table 1** RIPA and CBA  $\alpha 3$ -Subunit-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptor Antibody Titers of All RIPA-Positive Patients and Summary of Clinical Characterization<sup>a</sup>

Patient number	Country	F:M	Age at onset	Months with autonomic dysautonomia symptoms	Disease	RIPA antibody level (nM)	CBA titer ( $\alpha 3\beta 4$ )	CBA titer ( $\alpha 3\beta 2$ )	CBA ratio $\alpha 3\beta 4/\alpha 3\beta 2$	RIPA level (nM) needed for $\alpha 3\beta 4$ CBA+
1	IT	F	67	180	AAG	3.35	1,000	250	4	0.034
2	IT	M	56	48	AAG	3.22	1,000	600	1.7	0.032
3	IT	M	77	108	AAG	2.73	1,000	250	4	0.027
4	IT	M	65	192	AAG	2.20	1,250	250	5	0.018
5	IT	F	64	3	AAG	1.94	250	250	1	0.078
6	GR	F	70	24	AAG	1.40	1,000	1,000	1	0.014
7	IT	F	59	180	AAG	1.25	250	100	2.5	0.050
8	GR	F	67	4	AAG	1.17	300	300	1	0.039
9	IT	F	71	30	AAG	0.98	200	100	2	0.049
10	IT	M	65	18	AAG	0.94	200	200	1	0.047
11	IT	M	53	96	AAG	0.92	200	250	0.8	0.046
12	IT	F	66	132	AAG	0.90	200	200	1	0.045
13	GR	M	54	2	AAG	0.83	1,000	1,000	1	0.008
14	IT	M	49	180	AAG	0.53	200	100	2	0.027
15	IT	M	24	18	POTS	0.13	Negative	Negative		
16	GR	M	35	48	POTS	0.11	Negative	Negative		
17	GR	M	47	n.a.	IMG	0.06	Negative	Negative		
18	IT	M	60	12	AAG	0.05	10	Ambiguous	>1	0.050
19	GR	F	44	12	ASG	0.05	Negative	Negative		
<b>Average</b>									1.9	0.038 ± 0.018
<b>Patients with antibodies to Hu or VGCC</b>										
					Antigen					
20	GR	F			Hu <sup>+</sup>	0.11	Negative	Negative		
21	GR	M			VGCC <sup>+</sup>	0.10	Negative	Negative		
22	GR	F			Hu <sup>+</sup>	0.08	Negative	Negative		
23	GR	F			VGCC <sup>+</sup>	0.07	Negative	NT		
24	GR	F			VGCC <sup>+</sup>	0.07	Negative	Negative		
25	GR	M			VGCC <sup>+</sup>	0.06	Negative	Negative		

Abbreviations: AAG = autoimmune autonomic ganglionopathy; ASG = autoimmune sensory ganglionopathy; CBA = cell-based-assay; IMG = inflammatory myenteric ganglionopathy; n.a. = not applicable; POTS = postural orthostatic tachycardia syndrome; RIPA = radioimmunoprecipitation assay; VGCC = voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels P/Q-type.

<sup>a</sup> Patients are presented in decreasing order of their RIPA antibody level.

simultaneously incubated with the third antibody for the human serum (Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit IgG [H + L]).

### Statistical Analysis

We tested both RIPA and CBA variables for normality, and given the small data set, we used the Shapiro-Wilk test. To

explore possible associations, we used the Pearson correlation coefficient and the coefficient of determination R<sup>2</sup>.

### Data Availability

Reasonable requests from any qualified investigator for anonymized data will be satisfied.

## Results

### Identification of Sera Positive for $\alpha 3$ -nAChR Antibodies by RIPA

Two patient cohorts were tested by RIPA for  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR serum antibodies: (1) 55 patients suspected for AAG referred from Greek clinics to Tzartos NeuroDiagnostics and (2) 13 RIPA-positive patients already found positive in Carlo Besta, Milan, by RIPA with  $^{125}\text{I}$ -labeled IMR32 nAChR extracts and with verified final clinical diagnosis.

In total, 6/55 patients of the Greek cohort were positive, 3 with high (1.2–1.5 nM) and 3 with low (0.05–0.11 nM) antibody levels (Table 1). In addition, all 13 patients of the Milan cohort were also found positive by the  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR RIPA: 11 of them with medium-to-high antibody concentrations (0.53–3.35 nM) and 2 with low concentrations (0.05 and 0.13 nM) (Table 1). We also tested 31 sera from patients with VGCC antibodies and 21 from patients with antibodies to the paraneoplastic antigen Hu; 6 sera were found  $\alpha 3$ -nAChR RIPA positive, all with low antibody levels, 0.06–0.11 nM (Table 1); i.e., overall, 25 sera were identified as RIPA positive.

### Development of a Sensitive CBA for $\alpha 3$ -nAChR Antibodies. Optimization of Conditions

Myc-flag and GFP tags reduced nAChR expression; therefore, we used untagged subunits in the following experiments, detecting their expression with RIPA-positive sera, and anti- $\beta 2$  mAb-295, to determine the optimal conditions for a very sensitive CBA.

The expression of  $\alpha 3\beta 4$ - and  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs was compared at 4 conditions: (1) with only chaperon RIC3, (2) with RIC3 and NACHO, (3) with RIC3 and culture with 1 mM nicotine 24 hours after transfection, or (4) with RIC3, NACHO, and nicotine. Figure 1 and eTable 1, [links.lww.com/NXI/A707](https://links.lww.com/NXI/A707), show that the combined use of both chaperons and nicotine resulted in the strongest staining for both  $\alpha 3$ -nAChRs. Therefore, we used all 3 factors in all subsequent experiments. Similarly, the use of these factors was also beneficial for  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR expression (not shown). None of the Greek or Italian cohorts suspected for autonomic failure had antibodies to  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR.

Coincubation of  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR HEK293 cells with positive sera (no. 2 and 13) and the anti- $\beta 2$  mAb-295 revealed excellent colocalization, confirming that serum antibodies indeed bound to nAChRs (Figure 1B). Moreover, Figure 1C shows that serum antibody bound on viable cells; antibody-labeled cells were  $\sim 1/5$  of the total cells.

### Binding of Patients' Sera to Cell-Exposed $\alpha 3$ -nAChR by CBA and Comparison With Their Binding to Solubilized nAChR by RIPA

Using the live CBAs with  $\alpha 3\beta 4$ - and  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs, with optimized conditions, we screened all 25 RIPA-positive sera

and sera from the 49 patients referred for  $\alpha 3$ -nAChR antibodies but found RIPA negative. As controls we screened the remaining control 2,674 sera.

Fifteen RIPA-positive patients were  $\alpha 3$ -nAChR CBA positive (Table 1). Figure 2 shows binding of selected sera to  $\alpha 3\beta 4$ - and  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs but not to the control-transfected cells. Figure 3 shows that correlation between RIPA and CBA values exists; however, it is rather weak ( $R^2 = 0.502$ ), while a stronger association was observed for the log-log transformation of RIPA and CBA values ( $R^2 = 0.77$ ).

Importantly, all sera from the 2,674 controls and all RIPA-negative sera from the 49 patients referred for  $\alpha 3$ -nAChR antibodies were CBA negative, further confirming the specificity of the assay (9 sera showed nonspecific weak staining, similar to the control-transfected cells).

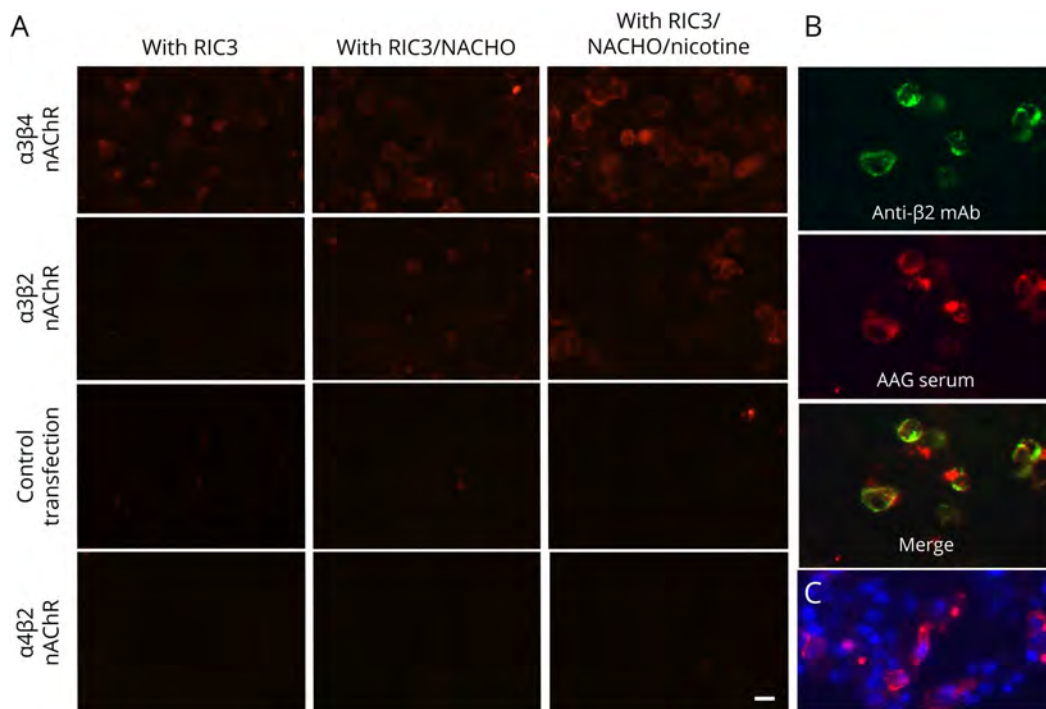
Although half of the CBA-positive sera had similar CBA titers for  $\alpha 3\beta 4$ - and  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs, the other half had higher titers with the  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR. On the average,  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR CBA resulted in nearly 2 times higher titers than  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR CBA but varying from 0.8 to 5.0 times higher (Table 1). Yet, almost all sera positive for  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR were also positive for  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, suggesting that all sera contain anti- $\alpha 3$  antibodies, with or without anti- $\beta 2/\beta 4$  antibodies.

Although most CBA-positive sera had high RIPA levels, and all CBA negative had low RIPA levels, apparently antibody concentration was not the limiting factor for CBA positivity because CBA could efficiently detect low antibody concentrations in patients with AAG. Table 1 (last column) presents the calculated minimum RIPA levels, which would be needed for positive CBA (at the adopted 1/10 dilution). These minimum RIPA levels for CBA positivity are derived from the ratio:  $[\text{RIPA}]/[\text{CBA}]$  multiplied by 10 (because the adopted test serum dilution is 1/10). It is shown that an average  $0.038 \pm 0.018$  nM RIPA values would be sufficient for CBA positivity. Taking into account that the RIPA cutoff is 0.05 nM, we conclude that CBA is at least as sensitive as the RIPA.

### Clinical Characterization of Patients Whose Sera Were Positive for $\alpha 3$ -nAChR Antibodies by RIPA and/or CBA Shows Superiority of the CBA, With High Specificity for AAG

Clinical characterization of the 19 RIPA-positive AAG-suspected patients showed that 15 had AAG (with autonomic symptoms including orthostatic hypotension, impaired pupil response to light, erectile dysfunction, constipation, bladder symptoms, loss of sweating, lightheadedness, and dry mouth and/or dry eyes, without any additional symptoms from the peripheral nervous system or CNS), whereas the remaining 4 patients had other neurologic diseases (Table 2 and eTable 2, [links.lww.com/NXI/A707](https://links.lww.com/NXI/A707)). However, in terms of RIPA concentration, all 14 patients with medium to high  $\alpha 3$ -nAChR antibody concentration had AAG, whereas only 1 of the 5 low RIPA patients had AAG. Among the remaining 4

**Figure 1** Optimization of the  $\alpha 3$ -nAChR Cell-Based-Assay



(A) Treatment of  $\alpha 3$ -nAChR-transfected HEK293 cells, with RIC3, NACHO, and nicotine increases significantly the expression of these receptors. Cells expressing  $\alpha 3\beta 4$ -,  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs, or control molecules AQP4 and  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR were cotransfected with 1 (RIC3) or 2 (RIC3 and NACHO) chaperons and cultured in the presence or absence of 1 nM nicotine. Cells were then incubated with the serum of a patient with autoimmune autonomic ganglionopathy with positive RIPA titer for  $\alpha 3$ -nAChR. Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) Colocalization of patient 2 serum with the rat anti- $\beta 2$  mAb. (C) Colocalization of  $\alpha 3$ -nAChR antibody binding and cell nucleus/DNA staining. The fluorescent signal of patient 13 antibodies was counterstained with Hoechst (for cell nucleus staining).  $\alpha 3$ -nAChR =  $\alpha 3$ -subunit-containing nicotinic acetylcholine receptor; RIPA = radioimmunoprecipitation assay.

low RIPA patients, 2 had POTS, 1 had autoimmune sensory ganglionopathy with Sjögren disease, and 1 had inflammatory myenteric ganglionopathy.

Of interest, the CBA, opposed to RIPA, detected  $\alpha 3$ -AChR antibodies selectively in all 15 patients with AAG, independently of the RIPA level, but in none of the 4 patients without AAG, despite their RIPA positivity (i.e., 100% specificity for AAG). Patient 18, with low RIPA level and marginal CBA positivity, had a limited form of AAG (loss of sweating, dry eyes and mouth, and lightheadedness with only a transient episode of hypotension). In addition, none of the 6 RIPA-positive patients with VGCC or Hu antibodies was CBA positive; it should be noted that none of these patients had mentioned any features of dysautonomia.

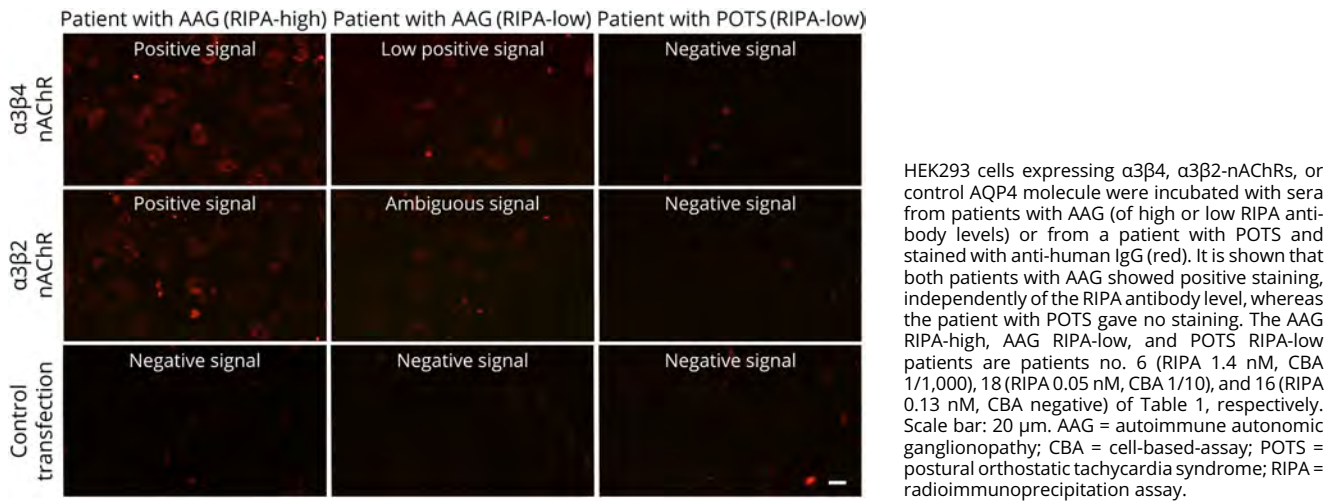
### Ig Class and Subclass of the $\alpha 3$ -nAChR Antibodies Determined by CBA

Finally, we determined the Ig class/subclass of the  $\alpha 3$ -nAChR antibodies by CBA because this characteristic may be related to their pathogenicity. eTable 3, [links.lww.com/NXI/A707](https://www.lww.com/NXI/A707), shows that all tested CBA-positive sera contain  $\alpha 3$ -nAChR antibodies of the complement-binding IgG1 subclass. In addition, 4 sera also contained IgG2 and/or IgG3 or IgM antibodies.

## Discussion

In this study, we introduce a novel assay (a sensitive live CBA) for the detection of  $\alpha 3$ -nAChR antibodies, at least as sensitive as the currently established RIPA, but, importantly, apparently AAG specific. Detection of autoantibodies against nAChRs containing the  $\alpha 3$ -subunit ( $\alpha 3$ -nAChR/ganglionic nAChR) for the serologic diagnosis of AAG has been usually performed by a RIPA developed by Vernino et al.<sup>7</sup> who have discovered the presence of  $\alpha 3$ -nAChR antibodies in AAG using solubilized  $\alpha 3$ -AChR (from extracts of  $\alpha 3$ -nAChR-bearing cells) preincubated with <sup>125</sup>I-epibatidine. This assay has revolutionized diagnosis and therefore the proper treatment of AAG.<sup>5,6</sup> In addition, another group<sup>10</sup> developed a luciferase immunoprecipitation system (LIPS) for the detection of antibodies to individually expressed  $\alpha 3$  or  $\beta 4$  nAChR subunits.<sup>10</sup> Recently, a FACS assay has been described<sup>25</sup> with IMR32 cells, detecting potentially pathogenic  $\alpha 3$ -nAChR antibodies in high RIPA samples, in agreement with an earlier study on the immunomodulating capacity of the  $\alpha 3$ -nAChR antibodies.<sup>26</sup> This assay may prove an attractive diagnostic assay, especially if it can substitute the IMR32 cells with  $\alpha 3$ -nAChR-transfected and control-untransfected cells and confirm a high specificity and sensitivity.

**Figure 2** The Novel CBA With  $\alpha 3\beta 4$ -nAChR–Transfected HEK293 Cells Detects Antibodies in Sera With High or Low RIPA Antibody Levels Specifically in Patients With AAG



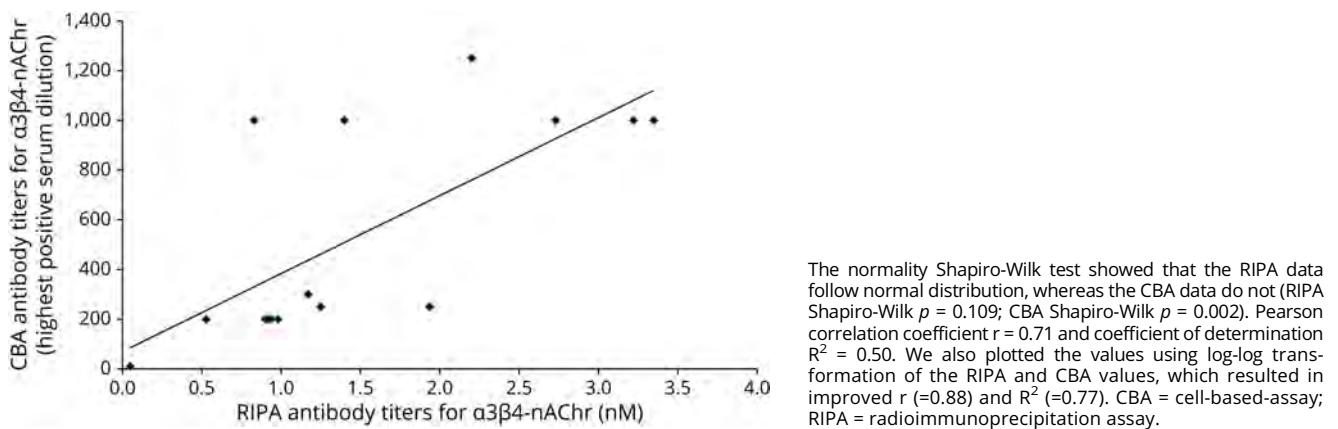
Although the RIPA and secondarily the LIPS have been invaluable for AAG diagnosis, they are not without caveats. Important limitations are as follows: (1) about 50% of the low antibody concentration seem nonspecific, present in various neurologic disease<sup>11,27</sup>; (2) both assays, using detergent-solubilized nAChR or subunits, cannot discriminate between antibodies to cell-exposed nAChR (i.e., the potentially pathogenic) and antibodies to in vivo inaccessible nAChR sites; (3) RIPA can be performed only in laboratories eligible to use radioactivity; and (4) LIPS uses individual nAChR subunits, which probably lack several intact epitopes.

Over the last decade, it has been shown that CBAs are superior for detecting autoantibodies of clinical significance.<sup>16,23,24</sup> In live CBAs, the detected antibodies bind to extracellular epitopes of the antigens in native conformation, that is, they are potentially pathogenic. By excluding the detection of

nonpathogenic antibodies, CBA is generally more disease specific than other assays. In addition, live CBA preserves the intact conformation of the epitopes, contrary to fixed-cell CBAs and other assays, improving the specificity of the assay. Thus, live CBAs are now the gold standard assays for the detection of several autoantibodies to cell surface antigens involved in neuroimmune diseases.<sup>14,15</sup>

Until recently, the development of sensitive and reliable CBAs for antibodies to neuronal nAChRs was too difficult because of their low surface expression.<sup>17,26</sup> However, the chaperons RIC3 and NACHO and nicotine have shown to increase expression of some nAChR subtypes.<sup>17,19,28</sup> Herein, we tested the effect of these 3 factors on  $\alpha 3$ -nAChR expression by the transfected HEK293 cells. In addition, nAChR subunits were untagged because the use of myc-flag or GFP tags reduced nAChR expression. We found that the combined use of

**Figure 3** Correlation of  $\alpha 3$  nAChR Antibody Levels by RIPA vs CBA Titers for the 15 Patients With Autoimmune Autonomic Ganglionopathy



**Table 2** Summary of Clinical Characteristics of the  $\alpha 3$ -Subunit-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptor Antibody-Positive Patients

	RIPA+/CBA+	RIPA+/CBA-
F/M	7/8	2/2
Age at onset (y)	62.9 $\pm$ 7.6	37.5 $\pm$ 10.3
Months with autonomic dysautonomia symptoms	84.2 $\pm$ 75.1	26.0 $\pm$ 19.3
<b>Autonomic manifestations</b>		
Orthostatic hypotension without heart rate changes	15/15 (100%)	0/4 (0%)
Severe constipation	13/15 (87%)	1/4 (25%)
Bladder retention	5/15 (33%)	0/4 (0%)
Loss of sweating	9/15 (60%)	1/3 (33%)
Lightheadedness	11/15 (73%)	2/4 (50%)
Dry mouth and/or dry eyes	14/15 (93%)	0/4 (0%)
<b>Extra-autonomic manifestations</b>		
Any specific CNS findings (memory deficits, altered level of consciousness, lethargy, personality change, psychosis or epilepsy, ataxia, and parkinsonism)	0/15 (0%)	1/4 (25%)
Any specific PNS symptoms (i.e., peripheral neuropathy)	0/15 (0%)	0/4 (0%)
Any specific brain symptoms or imaging findings	0/15 (0%)	1/4 (25%)
Presence of any specific cancer?	0/15 (0%)	0/4 (0%)
Other autoimmune diseases?	3/15 (20%)	1/4 (25%)

Abbreviations: CBA = cell-based assay; RIPA = radioimmunoprecipitation assay.

chaperons, nicotine, and untagged subunits resulted in the most sensitive live CBA.

The major advantage of our  $\alpha 3$ -nAChR CBA is on its disease specificity. As described above, with the currently used assays, about 50% of the patients with low  $\alpha 3$ -nAChR antibody levels present a variety of disorders other than AAG, including POTS,<sup>13</sup> small- and large-fiber neuropathy, encephalitis, LEMS, and Hu-related paraneoplastic disorders, of unknown clinical significance.<sup>5,7,11</sup> Therefore, the significance of a low RIPA antibody level is questionable. Of interest, we observed that our CBA is AAG specific. Specifically, all 15 patients with AAG were both RIPA and CBA positive (Table 1). Although the majority of these patients had medium to high RIPA levels (i.e., considered AAG specific), 1 patient had a borderline RIPA (0.05 nM) and yet was also CBA positive. Of interest, this patient had a limited form of AAG, probably due to the very low  $\alpha 3$ -nAChR antibody titers (by RIPA and CBA) in agreement with Vernino et al.<sup>21</sup> conclusions

for limited forms of AAG in patients with intermediate antibody levels. Further studies should define how marginal  $\alpha 3$ -CBA titers should be evaluated. In contrast, all 4 patients without AAG, with low RIPA levels (0.05–0.13 nM), were CBA negative. The predominant IgG subclass of the  $\alpha 3$ -nAChR antibodies of the CBA-positive patients was IgG1, very efficient in inducing effector mechanisms and therefore damaging the  $\alpha 3$ -nAChR-bearing cells. IgM antibodies were a minority, detected in only 1 patient. Similarly, preliminary RIPA experiments with high-titer sera and anti-Fc-IgG for precipitation suggested that the majority of the RIPA-detected  $\alpha 3$ -nAChR antibodies are IgG.

Importantly, none of the 2,680 control sera from patients verified or suspected for various neuroimmune diseases was found  $\alpha 3$ -CBA positive. These included the 52 patients with anti-VGCC or anti-Hu antibodies, 6 of which were found  $\alpha 3$ -nAChR RIPA positive but CBA negative.

All sera of Table 1 were tested with CBA with both ganglionic nAChR subtypes,  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 3\beta 2$ . All CBA-positive sera bound to both nAChRs, strongly suggesting that all had antibodies to the  $\alpha 3$  subunit. This is further supported by the fact that none of these sera bound to the  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR; therefore, any binding to  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR should be due to binding to the  $\alpha 3$  subunit. However, there was very considerable variation in the titer ratio between  $\alpha 3\beta 4$ - and  $\alpha 3\beta 2$ -nAChRs among the different sera, from 0.8 to 5 (average 1.9). The high  $\alpha 3\beta 4/\alpha 3\beta 2$  CBA ratios in several sera (6/15 sera with ratio  $\geq 2$ ) could be attributed to several possible reasons: (1) some sera may also contain anti- $\beta$  antibodies, especially anti- $\beta 4$ ; (2) several mostly  $\alpha 3$ -subunit antibodies may bind to epitopes on the different  $\alpha 3\beta 2/\alpha 3\beta 4$  subunit interphases; (3) the 2 different  $\beta$ -subunits may impose different conformational changes on the  $\alpha 3$  epitopes; or (4) the likely higher expression of  $\alpha 3\beta 4$  than  $\alpha 3\beta 2$ <sup>19</sup> could have affected the CBA titers. Although anti- $\beta 4$  antibodies may exist,<sup>10,29</sup> Nakane et al.<sup>10</sup> showed that anti- $\beta 4$  antibodies are generally much fewer than the anti- $\alpha 3$  antibodies, which cannot justify the large heterogeneity in  $\alpha 3\beta 4/\alpha 3\beta 2$  CBAs. Any difference in expression efficiency between the 2 nAChRs would be expected to have similar effect on the binding of all sera. Therefore, we suggest that differences in subunit interphases and/or conformational differences on the  $\alpha 3$  subunits between the 2 nAChRs are the most likely reasons for the different CBA titers between the 2 nAChRs.

In conclusion, our findings suggest that the novel CBA for  $\alpha 3$ -nAChR antibodies is at least equally sensitive with the currently established RIPA, and, importantly, contrary to RIPA, it is highly AAG specific. Furthermore, in contrast to RIPA, which can be performed only in laboratories eligible to use radioactivity, this CBA, following our suggested conditions for high  $\alpha 3$ -nAChR expression, can be performed by many laboratories worldwide. Because of the limited number of patients with AAG of the current investigation, further studies on larger patient cohorts are needed to evaluate the exact specificity and sensitivity of this assay and to better determine AAG as a clinical entity.

## Acknowledgment

The authors thank Prof. Sotirios Giannopoulos, Prof. Konstantinos Kotsis, and Dr. Christos Stergiou for valuable discussions and suggestions. They also thank Aliko Papakonstantinou, Christiana Vasileiadi, and Vassiliki Papadopoulou for technical assistance in some experiments.

## Study Funding

(1) By the European Union and Greek national funds through the Operational Program Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation (EPANEK), under the call Research Create Innovate (project code: T1EDK- 05024, MIS 5032815); (2) by a grant from ERA-NET NEURON JTC 2019 and Greek national funds through the EPANEK, under the priority axis: Enhancing entrepreneurship with sectoral priorities (project code: MIS 5075033); (3) by a grant from the Stavros Niarchos Foundation; and (4) by a grant from the Italian Ministry of Health (grant RF-2013-02355242).

## Disclosure

S. Tzartos has shares in the research and diagnostic laboratory Tzartos NeuroDiagnostics. J. Tzartos and S. Tzartos are co-inventors in a patent that relates to the detection of antibodies to aquaporin 1. All other authors declare no conflict of interest. Go to [Neurology.org/NN](http://Neurology.org/NN) for full disclosures.

## Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* October 10, 2021. Accepted in final form February 10, 2022. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Josep O. Dalmau, MD, PhD, FAAN.

## Appendix Authors

Name	Location	Contribution
<b>Katerina Karagiorgou, MSc</b>	Tzartos NeuroDiagnostics, Athens, Greece; Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
<b>Maria Dandoulaki, PhD</b>	Tzartos NeuroDiagnostics, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
<b>Renato Mantegazza, MD</b>	Neuroimmunology and Neuromuscular Diseases Unit, Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Francesca Andreetta, PhD</b>	Neuroimmunology and Neuromuscular Diseases Unit, Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data

## Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
<b>Raffaello Furlan, MD</b>	Department of Biomedical Sciences Humanitas University, Milan, Italy	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Jon Lindstrom, PhD</b>	Department of Neuroscience, Medical School, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
<b>Paraskevi Zisimopoulou, PhD</b>	Department of Neurobiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
<b>Elisabeth Chroni, MD, PhD</b>	Department of Neurology, School of Medicine, University of Patras	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
<b>Panagiotis Kokotis, MD, PhD</b>	1st Department of Neurology, School of Medicine, Eginition Hospital, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Evangelos Anagnostou, MD, PhD</b>	1st Department of Neurology, School of Medicine, Eginition Hospital, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Dimitrios Tzanetakos, MD</b>	1st Department of Neurology, School of Medicine, Eginition Hospital, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and analysis or interpretation of data
<b>Marianthi Breza, MD</b>	1st Department of Neurology, School of Medicine, Eginition Hospital, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and analysis or interpretation of data
<b>Zoe Katsarou, MD, PhD</b>	Department of Neurology, Hippokraton Hospital, Thessaloniki, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Georgios Amoiridis, MD, PhD</b>	Neurology Department, University Hospital of Crete, Heraklion, Crete, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Vasileios Mastorodemos, MD, PhD</b>	Neurology Department, University Hospital of Crete, Heraklion, Crete, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data

Continued

## Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
<b>Marianna Bregianni, MD, PhD</b>	2nd Department of Neurology, Attikon University Hospital, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Anastasios Bonakis, MD, PhD</b>	2nd Department of Neurology, Attikon University Hospital, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
<b>Georgios Tsivgoulis, MD, PhD</b>	2nd Department of Neurology, Attikon University Hospital, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and analysis or interpretation of data
<b>Konstantinos Voumvourakis, MD, PhD</b>	2nd Department of Neurology, Attikon University Hospital, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and analysis or interpretation of data
<b>Socrates Tzartos, PhD</b>	Tzartos NeuroDiagnostics, Athens, Greece; Department of Neurobiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
<b>John Tzartos, MD, PhD</b>	Tzartos NeuroDiagnostics, Athens, Greece; Attikon University Hospital, School of Medicine, NKUA, Athens, Greece	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data

## References

- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(9):733-750.
- Clementi F, Fornasari D, Gotti C. Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol*. 2000;393(1-3):3-10.
- Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol*. 1997;53(2):199-237.
- Graham AJ, Martin-Ruiz CM, Teaktong T, Ray MA, Court JA. Human brain nicotinic receptors, their distribution and participation in neuropsychiatric disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2002;1(4):387-397.
- Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G, Lennon VA. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N Engl J Med*. 2000;343(12):847-855.
- Vernino S, Lindstrom J, Hopkins S, Wang Z, Low PA, Muscle Study G. Characterization of ganglionic acetylcholine receptor autoantibodies. *J Neuroimmunol*. 2008;197(1):63-69.
- Vernino S, Adamski J, Kryzer TJ, Fealey RD, Lennon VA. Neuronal nicotinic ACh receptor antibody in subacute autonomic neuropathy and cancer-related syndromes. *Neurology*. 1998;50(6):1806-1813.
- Lennon VA, Ermilov LG, Szurszewski JH, Vernino S. Immunization with neuronal nicotinic acetylcholine receptor induces neurological autoimmune disease. *J Clin Invest*. 2003;111(6):907-913.
- Vernino S, Ermilov LG, Sha L, Szurszewski JH, Low PA, Lennon VA. Passive transfer of autoimmune autonomic neuropathy to mice. *J Neurosci*. 2004;24(32):7037-7042.
- Nakane S, Higuchi O, Koga M, et al. Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and the detection of subunit-specific autoantibodies to the ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118312.
- McKeon A, Lennon VA, Lachance DH, Fealey RD, Pittock SJ. Ganglionic acetylcholine receptor autoantibody: oncological, neurological, and serological accompaniments. *Arch Neurol*. 2009;66(6):735-741.
- Yamakawa M, Mukaino A, Kimura A, et al. Antibodies to the alpha3 subunit of the ganglionic-type nicotinic acetylcholine receptors in patients with autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2020;349:577399.
- Bryarly M, Raj SR, Phillips L, et al. Ganglionic acetylcholine receptor antibodies in postural tachycardia syndrome. *Neurol Clin Pract*. 2021;11(4):e397-e401.
- Yeh EA, Nakashima I. Live-cell based assays are the gold standard for anti-MOG-Ab testing. *Neurology*. 2019;92(11):501-502.
- Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(2):89-102.
- Waters PJ, McKeon A, Leite MI, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*. 2012;78(9):665-671.
- Gu S, Matta JA, Lord B, et al. Brain alpha7 nicotinic acetylcholine receptor assembly requires NACHO. *Neuron*. 2016;89(5):948-955.
- Kuryatov A, Mukherjee J, Lindstrom J. Chemical chaperones exceed the chaperone effects of RIC-3 in promoting assembly of functional alpha7 AChRs. *PLoS One*. 2013;8(4):e62246.
- Matta JA, Gu S, Davini WB, et al. NACHO mediates nicotinic acetylcholine receptor function throughout the brain. *Cell Rep*. 2017;19(4):688-696.
- Whiteaker P, Cooper JF, Salminen O, et al. Immunolabeling demonstrates the interdependence of mouse brain alpha4 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit expression. *J Comp Neurol*. 2006;499(6):1016-1038.
- Vernino S. Autoimmune autonomic disorders. *Continuum (Minneapolis)*. 2020;26(1):44-57.
- Barbic F, Dipaola F, Andreetta F, et al. Long-term cardiovascular autonomic and clinical changes after immunoglobulin G immunoadsorption therapy in autoimmune autonomic ganglionopathy. *J Hypertens*. 2017;35(7):1513-1520.
- Leite MI, Jacob S, Viegas S, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in "seronegative" myasthenia gravis. *Brain*. 2008;131(pt 7):1940-1952.
- Tzartos JS, Karagiorgou K, Tzanetakos D, et al. Deciphering anti-MOG IgG antibodies: clinical and radiological spectrum, and comparison of antibody detection assays. *J Neurol Sci*. 2020;15410:116673.
- Urriola N, Spies JM, Blazek K, Lang B, Adelstein S. A flow cytometric assay to detect functional ganglionic acetylcholine receptor antibodies by immunomodulation in autoimmune autonomic ganglionopathy. *Front Immunol*. 2021;12:705292.
- Kobayashi S, Yokoyama S, Maruta T, et al. Autoantibody-induced internalization of nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit exogenously expressed in human embryonic kidney cells. *J Neuroimmunol*. 2013;257(1-2):102-106.
- Li Y, Jammoul A, Mente K, et al. Clinical experience of seropositive ganglionic acetylcholine receptor antibody in a tertiary neurology referral center. *Muscle Nerve*. 2015;52(3):386-391.
- Papke RL, Lindstrom JM. Nicotinic acetylcholine receptors: conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology*. 2020;168:108021.
- Nakane S, Mukaino A, Higuchi O, et al. Autoimmune autonomic ganglionopathy: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. 2018;18(12):953-965.

# Neurology<sup>®</sup> Neuroimmunology & Neuroinflammation

## Novel Cell-Based Assay for Alpha-3 Nicotinic Receptor Antibodies Detects Antibodies Exclusively in Autoimmune Autonomic Ganglionopathy

Katerina Karagiorgou, Maria Dandoulaki, Renato Mantegazza, et al.

*Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022;9;

DOI 10.1212/NXI.0000000000001162

This information is current as of March 29, 2022

<b>Updated Information &amp; Services</b>	including high resolution figures, can be found at: <a href="http://nn.neurology.org/content/9/3/e1162.full.html">http://nn.neurology.org/content/9/3/e1162.full.html</a>
<b>References</b>	This article cites 29 articles, 2 of which you can access for free at: <a href="http://nn.neurology.org/content/9/3/e1162.full.html##ref-list-1">http://nn.neurology.org/content/9/3/e1162.full.html##ref-list-1</a>
<b>Subspecialty Collections</b>	This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s): <b>Autoimmune diseases</b> <a href="http://nn.neurology.org/cgi/collection/autoimmune_diseases">http://nn.neurology.org/cgi/collection/autoimmune_diseases</a> <b>Autonomic diseases</b> <a href="http://nn.neurology.org/cgi/collection/autonomic_diseases">http://nn.neurology.org/cgi/collection/autonomic_diseases</a>
<b>Permissions &amp; Licensing</b>	Information about reproducing this article in parts (figures,tables) or in its entirety can be found online at: <a href="http://nn.neurology.org/misc/about.xhtml#permissions">http://nn.neurology.org/misc/about.xhtml#permissions</a>
<b>Reprints</b>	Information about ordering reprints can be found online: <a href="http://nn.neurology.org/misc/addir.xhtml#reprintsus">http://nn.neurology.org/misc/addir.xhtml#reprintsus</a>

*Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* is an official journal of the American Academy of Neurology. Published since April 2014, it is an open-access, online-only, continuous publication journal. Copyright Copyright © 2022 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology.. All rights reserved. Online ISSN: 2332-7812.





## Deciphering anti-MOG IgG antibodies: Clinical and radiological spectrum, and comparison of antibody detection assays

John S. Tzartos<sup>a,b,\*</sup>, Katerina Karagiorgou<sup>b,c</sup>, Dimitrios Tzanetakos<sup>a</sup>, Marianthi Breza<sup>a</sup>, Maria Eleftheria Evangelopoulos<sup>a</sup>, Sygkliti-Henrietta Pelidou<sup>d</sup>, Christos Bakirtzis<sup>e</sup>, Ioannis Nikolaidis<sup>e</sup>, Georgios Koutsis<sup>a</sup>, Konstantinos Notas<sup>f</sup>, Elisabeth Chroni<sup>g</sup>, Ioannis Markakis<sup>h</sup>, Nikolaos C. Grigoriadis<sup>e</sup>, Maria Anagnostouli<sup>a</sup>, Anastasios Orologas<sup>f</sup>, Dimitrios Parisi<sup>e</sup>, Theodoros Karapanayiotides<sup>e</sup>, Dimitra Papadimitriou<sup>i</sup>, Vasiliki Kostadima<sup>d</sup>, John Elloul<sup>g</sup>, Iosif Xidakis<sup>h</sup>, Thomas Maris<sup>j</sup>, Paraskevi Zisimopoulou<sup>k</sup>, Socrates Tzartos<sup>b,k</sup>, Costas Kilidireas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 1st Department of Neurology, Eginition Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 72-74, Vas. Sofias Ave, Athens 11528, Greece

<sup>b</sup> Tzartos NeuroDiagnostics, 3, Eslin str., Athens 11523, Greece

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

<sup>d</sup> Neurology Department, University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece

<sup>e</sup> 2nd Neurology Department, University Hospital of Thessaloniki "AHEPA", Thessaloniki, Greece

<sup>f</sup> Saint Luke's Hospital, Panorama, Thessaloniki 552 36, Greece

<sup>g</sup> Neurology Department, University Hospital of Patras, Rio 265 04, Greece

<sup>h</sup> Neurology Department, General Hospital of Nikaia, 3, Andrea Petrou Mandouvalou, Athens 184 54, Greece

<sup>i</sup> Neurology Department, Henry Dunant Hospital, Athens, Greece

<sup>j</sup> Neurology Clinic, Venizeleio General Hospital, Knossos Ave, Heraklion 714 09, Greece

<sup>k</sup> Lab. of Molecular Neurobiology and Immunology, Hellenic Pasteur Institute, 127, Vas. Sofias Ave., Athens 11521, Greece

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Neuromyelitis optica  
Myelin oligodendrocyte glycoprotein  
Demyelinating disorders  
Autoantibodies  
Cell base assay  
MOG-antibody associated diseases

### ABSTRACT

IgG antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) detected by cell based assays (CBA) have been identified in a constantly expanding spectrum of CNS demyelinating disorders. However, a universally accepted CBA has not been adopted yet. We aimed to analyze the clinical and radiological features of patients with anti-MOG IgG1-antibodies detected with a live-cell CBA and to compare the three most popular MOG-CBAs. We screened sera from 1300 Greek patients (including 426 patients referred by our 8 clinics) suspected for anti-MOG syndrome, and 120 controls with the live-cell MOG-CBA for IgG1-antibodies. 41 patients, versus 0 controls were seropositive. Clinical, serological and radiological data were available and analyzed for the 21 seropositive patients out of the 426 patients of our clinics. Their phenotypes were: 8 optic neuritis, 3 myelitis, 3 neuromyelitis optica, 2 encephalomyelitis, 2 autoimmune encephalitis and 3 atypical MS. We then retested all sera of our 426 patients with the other two most popular MOG-CBAs for total IgG (a live-cell and a commercial fixed-cell CBAs). Seven IgG1-seropositive patients were seronegative for one or both IgG-CBAs. Yet, all 21 patients had clinical and radiological findings previously described in MOG-antibody associated demyelination disease supporting the high specificity of the IgG1-CBA. In addition, all IgG1-CBA-negative sera were also negative by the IgG-CBAs. Also, all controls were negative by all three assays, except one serum found positive by the live IgG-CBA. Overall, our findings support the wide spectrum of anti-MOG associated demyelinating disorders and the superiority of the MOG-IgG1 CBA over other MOG-CBAs.

**Abbreviations:** ADEM, acute disseminated encephalomyelitis; CBA, cell base assay; IgG1-CBA, live-cell anti-MOG CBA with anti-IgG1 as secondary antibody; IgG(Fc)-CBA, live-cell anti-MOG CBA with anti-(Fc fragment of IgG) as secondary antibody; IgG(H + L)-CBA, live-cell anti-MOG CBA with anti-IgG(H + L) as secondary antibody; LEM, Longitudinal extensive myelitis; LETM, longitudinal extensive transverse myelitis; MMF, mycophenolate mophetyl; NMO, neuromyelitis optica; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; MOG-disease, MOG-antibody associated disease; NMOSd, neuromyelitis optica spectrum disorders; ON, optic neuritis; CRION, chronic relapsing inflammatory optic neuropathy

\* Corresponding author at: 1st Department of Neurology, Eginition Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 72-74, Vas. Sofias Ave, Athens 11528, Greece.

E-mail address: [jtzartos@gmail.com](mailto:jtzartos@gmail.com) (J.S. Tzartos).

<https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116673>

Received 23 October 2019; Received in revised form 17 December 2019; Accepted 3 January 2020

Available online 07 January 2020

0022-510X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

IgG antibodies specific for the native form of MOG have been detected in a broad spectrum of demyelinating disorders of the CNS, with important clinical implication [18,24]. This includes acute disseminated encephalomyelitis (ADEM), neuromyelitis optica (NMO), optic neuritis (ON), myelitis, brainstem encephalitis [6,9], atypical multiple sclerosis (MS) [26], and more recently, autoimmune encephalitis [5,22]. In vitro studies have shown that IgG anti-MOG antibodies can have pathogenic properties with complement activation [19] or activation of naïve T cells to encephalitogenic ones [14]. In animal models, anti-MOG antibodies can induce CNS demyelination, through pathogenic T- and B-cell responses [1,16,17,28]. Their pathogenicity in humans has also been supported in studies of biopsies or postmortem brain tissue from 6 patients with tumefactive brain lesions [7,10,15,27,32], positive for MOG antibodies. However, antibodies to the non-native form of MOG, using ELISA, or anti-MOG antibodies of the less specific IgM may not play a relevant clinical role [23] and may not be disease specific, since they are detected in several diseases as well as in healthy volunteers [34]. To avoid inclusion of false positive cases in the “MOG-disease” spectrum, several studies included only patients with high titers of total IgG anti-MOG antibodies [4], whereas others [13] included only cases positive for IgG1 anti-MOG antibodies even at low titers.

Despite the fact that several studies have already provided insights into the clinical and radiological spectrum of anti-MOG demyelinating diseases, there is a need for further studies to define the limits of the MOG-disease spectrum [2,20]. In addition, insufficient knowledge is yet available in order to establish the gold-standard assay for testing anti-MOG antibodies. Cell based assay (CBA) is by far the assay of preference for the identification of conformation dependent epitopes [25]. Yet, critical differences exist between variations of the CBA methods, used by different studies for anti-MOG testing [5,12,13,21,29,34,35].

In the present study, we sought to investigate the clinical and radiological spectrum of 21 patients positive for anti-MOG IgG1 antibodies identified in a Greek cohort of 426 patients suspected for suffering from MOG-disease. Furthermore, we compared the three most commonly used CBAs for anti-MOG antibody detection, using the sera of the 21 anti-MOG IgG1 positive patients and from 405 patients of our clinics found negative for IgG1 antibodies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

Over a period of two years (July 2016 to June 2018), we screened for the presence of anti-MOG antibodies, sera from 1300 patients (including 426 from our 8 clinics) referred by their neurologists for anti-MOG testing, after informed consent of the patients. The anti-MOG positive patients which were treated in our 8 clinics were then thoroughly studied for their clinical and radiological characteristics. In addition, 142 sera from healthy individuals and 40 sera from patients with AQP4 antibodies were included as negative controls. We could not have access to the clinical data of patients referred for routine diagnosis by other clinics and clinicians.

### 2.2. Cell based assay

All 1300 sera were screened using a live-cell CBA, as previously described [34], with HEK293 cells expressing the intact MOG molecule (Origene, Herford, Germany). As secondary antibody, we used Alexa Fluor-488 mouse anti-human IgG1 (A10631/Invitrogen) at 1/500 dilution and as tertiary antibody Alexa Fluor-488 goat anti-mouse IgG (H + L, A11001/Invitrogen) at 1/750 dilution. The cut-off serum dilution limit of positivity was 1/20 [34]; hereinafter referred as IgG1-CBA. The sera of all 426 patients of our clinics were then retested with

two additional CBAs: a. live-cell CBA for total anti-MOG IgG [IgG(Fc)-CBA]: as above, but using as secondary antibody the goat anti-human IgG (Fc specific)-Cy3 conjugated (C2571/Sigma) at 1/200 dilution, with cut-off serum dilution 1/160 for positivity, although sera were also tested at lower dilutions (1/20, 1/40, 1/80). Before the adoption of the anti-human IgG (Fc specific) secondary antibody, in preliminary studies, Alexa Fluor-568 goat anti-human IgG (H + L, A21090/Invitrogen) at 1/750 dilution was also used. As negative controls for all live-cell CBA, AQP4 transfected HEK293 cells were used. b. a commercial fixed-cell assay detecting again total IgG, tested only at 1/10 serum dilution for positivity as instructed by the manufacturer (Euroimmun, Lübeck, Germany). All sera were also tested with a commercial CBA kit for anti-AQP4 antibodies, according to the manufacturer (Euroimmun). Anti-MOG positive patients with a clinical diagnosis of autoimmune encephalitis were also screened for antibodies to a large panel of neuronal antigens, including NMDAR, GABABR, AMPAR, CASPR2 and LGI1, as well as for binding to rat hippocampus or cerebellum by immunohistochemistry, using commercial kits (Euroimmun).

### 2.3. Ethics

Ethical approval for the study was obtained by the Ethics Committee of the Eginition University Hospital (511/2018). Informed consent for inclusion in the study was obtained from the patients.

## 3. Results

### 3.1. Epidemiological data

We identified 41/1300 (3.2%) patients tested, seropositive for IgG1 anti-MOG antibodies. In comparison, in the same period we identified 37 (2.1%) anti-AQP4 positive patients out of 1800 patients (including most of the above 1300 patients). No patient was positive for both anti-MOG and anti-AQP4 antibodies. Clinical, serological and radiological data were available and analyzed from 21 of the 41 anti-MOG-IgG1 positive patients, among 426 patients referred by our clinics (Tables 1 and 2). Nineteen out of the 21 patients (19/21) were of Greek and 2 of Albanian origin; 12/21 were females, and all 21 manifested the disease between ages 13–73, with a mean age at onset  $34 \pm 16$  years. None of the negative controls was found positive by this assay.

### 3.2. Clinical spectrum of positive anti-MOG antibody patients

Clinical and radiological features of the 21 seropositive patients are presented in Tables 1 and 2, Figs. 1, 2 and 3). At disease onset, 10 patients had ON (3 with relapsing ON), 4 myelitis, 1 NMO, 3 atypical MS, 2 encephalitis and 1 had encephalomyelitis. During final assessment, two patients developed NMO, patient no.12 (Fig. 2A,B) with ON at onset and patient no.21 (Fig. 2C,D,E) with extensive myelitis at onset. Of note, in 3 patients we observed a change in the clinical disorder during the course of the disease: a. patient no.17, with ON at onset, 12 years later developed cortical encephalitis with the MRI showing right cortical high signal on FLAIR (Fig. 1A), continuous slowing with polymorphic sharp waveforms on the EEG over the right fronto-temporo-parietal region, CSF pleocytosis (200 WBC/mm<sup>3</sup>; 62% polymorphonuclear and 38% lymphocytes), absence of CSF oligoclonal bands, unremarkable for infectious agents, with complete recovery following a course of corticosteroids; b. on the contrary, patient no.8, at onset developed cortical encephalitis, with cortical meningeal gadolinium enhancement (Fig. 1B,C), CSF pleocytosis (190 WBC/mm<sup>3</sup>; 25% polymorphonuclear and 75% lymphocytes), absence of CSF oligoclonal bands, unremarkable for infectious agents, with complete clinical and radiological recovery (Fig. 1D) following a course of corticosteroids, however with a marked change to relapsing ON in the following years; c. patient no.16, at onset developed ON, followed by four relapses with main symptoms: hemiparesis, cerebellar ataxia and psychosis, with

**Table 1**  
Demographic and clinical features of the anti-MOG positive patients.

F:M	Greek origin	Age at onset	Months of neuro. symptomatology	Diagnosis at onset	Final diagnosis	Annual relapsing rate before/without treatment	Annual relapsing rate under treatment	Response to corticosteroids in the acute phase	Maintenance treatment	Oligoclonal bands	Final residual deficit (EDSS/Optic acuity: OA)	Main MRI features
1 M	YES	18	28	NMO	NMO	0	NA	YES	No	Yes	0	LETM
2 M	YES	73	22	ON	ON	0	0	NA	Azathioprine	Unknown	OA: 3/10 R	Non specific brain lesions
3 M	YES	36	10	ON	ON	0	NA	YES	No	NO	0	Non specific brain lesions
4 F	NO	29	29	ON	Relapsing ON	4	1	YES	Azathioprine	NO	0	Non specific brain lesions
5 F	YES	35	440	ON	Relapsing ON	0.06	0.7	YES	MMF	NO	OA: 9/10 BL	No lesions detected
6 M	YES	30	20	ON	ON	NA	0	YES	Azathioprine	NO	0	No lesions detected
7 F	YES	56	48	ON	Relapsing ON	NA	1	YES	Prednisolone	NO	OA: 7/10 R	Non specific brain lesions
8 F	YES	21	96	Cortical encephalitis	Relapsing ON	5	2	YES	MMF	Unknown	0	Extensive cortical lesion
9 F	YES	37	3	ON (bilateral)	ON (bilateral)	NA	NA	Yes	Azathioprine	NO	0	Jaxtacortical lesions
10 M	YES	32	12	Myelitis	Myelitis	0	NA	YES	No	NO	0	LETM
11 F	YES	16	2	Myelitis	Myelitis	NA	0	Yes	Methylprednisolone	NO	0	LETM
12 M	YES	61	12	ON	NMO	1	0	YES	Rituximab	YES	3	Non specific brain lesions and LETM
13 F	NO	19	23	Myelitis	Myelitis	NA	0	YES	Azathioprine	NO	2	Transverse myelitis, two segments long
14 M	YES	31	1	MS/myelitis	MS/myelitis	NA	NA	Yes	Methylprednisolone	YES	0	MS like brain lesions and extensive myelitis < 3 segments
15 M	YES	26	7	Encephalitis	Encephalitis	0	NA	NA	No	Unknown	0	No lesions detected
16 F	YES	13	456	ON	Encephalomyelitis	4	0	Yes	Azathioprine	NO	3	Tumefactive white matter lesion and LEM
17 M	YES	30	204	ON	Cortical encephalitis	0.06	NA	YES	No	NO	0	Extensive cortical lesion
18 F	YES	55	24	Encephalomyelitis	Encephalomyelitis	NA	0	YES	Azathioprine	YES	0	Tumefactive white matter lesion and LETM
19 F	YES	26	204	MS/myelitis	MS/myelitis	0	0	NO	Azathioprine	Unknown	4	MS like brain lesions and LETM
20 F	YES	22	168	Tumefactive MS	Tumefactive MS	0.92	NA	Yes	MS treatments	NO	4	Tumefactive lesions
21 F	YES	50	156	Myelitis	NMO	0.33	0	YES	Azathioprine	YES	1	LETM, brain stem peripendicular lesion

LETM, Longitudinal extensive transverse myelitis; LEM, Longitudinal extensive myelitis; ON, optic neuritis; MMF, Mycophenolate mofetil; NA, not applicable, due to the fact that they received immunosuppressive therapy for < 6 months (if any) or received immunosuppressive therapy immediately after diagnosis.

All diagnosis were based on clinical, radiological and laboratory findings, however without including the positivity of MOG antibodies.

**Table 2**

Average values of the demographic and clinical features and therapeutic intervention of the anti-MOG positive patients.

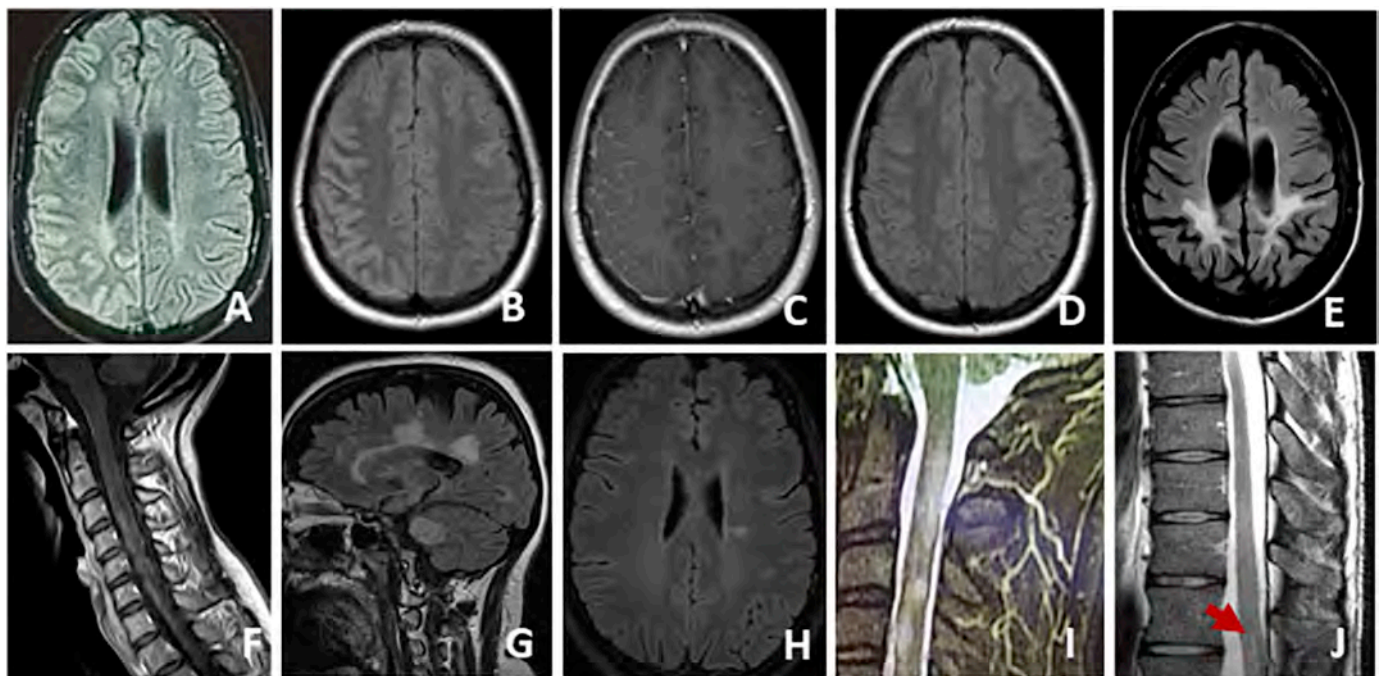
Female:Male	12:9 (57% F)
Greek origin	19/21 (90.5%)
Age at onset	34 ± 16
Months of neurol. symptomatology	93.6 + 135.8
Diagnosis at onset	1 NMO, 10 ON, 4 myelitis, 2 encephalitis, 1 Encephalomyelitis, 1 Tumefactive MS, 2 MS with extensive myelitis
Final diagnosis	3 NMO, 8 ON, 3 myelitis, 2 encephalitis, 2 encephalomyelitis, 1 tumefactive MS, 2 MS with extensive myelitis
Annual relapsing rate before/without treatment	1.1 ± 1.8
Annual relapsing rate during treatment	0.52 ± 0.7
Response to corticosteroids in the acute phase	18: YES, 1: No, 2: did not receive steroids
Maintenance treatment (> 6 months)	9 Azathioprine, 2 mycophenolate mofetil, 2 Methylprednisolone, 1 Prednisolone, 1 Rituximab, 1 IFN-b and glatiramer acetate, 1 only IFN-b and 5 no treatment
Oligoclonal bands	5 YES, 12: NO

final diagnosis of encephalomyelitis with coexistence of anti-NMDAR autoantibodies (Fig. 1E,F).

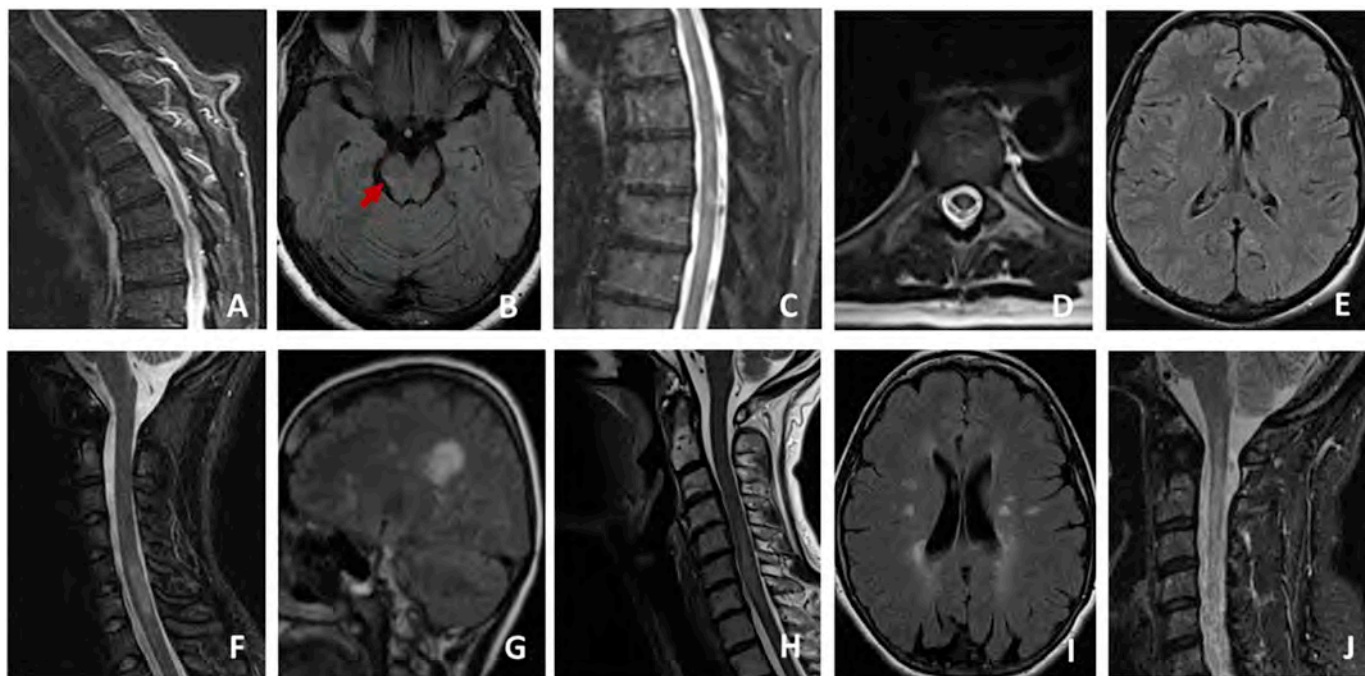
Three patients fulfilled 2017 revised MS criteria [30], however with atypical characteristics of MS. Specifically, patient no. 20 had tumefactive lesions (Fig. 1G), absence of oligoclonal bands and several episodes of ON during interferon-beta treatment. The second patient (no.14, published as a case report; [3]) had a few periventricular lesions in the brain white matter, with a Dawson finger (Fig. 1H), extensive cervical lesion load (< 3 vertebral segments long, Fig. 1I) and presence of oligoclonal bands in the CSF, however with a spinal cord lesion in the conus medullaris (Fig. 1J) and a flare phenomenon during steroid tapering, features previously described in MOG-antibody associated diseases [11]. The third patient (no. 19) had ovoid-like lesions located periventricular and juxtacortical, typical for MS (Fig. 2I), however with long extensive myelitis in the cervical (Fig. 2J) and thoracic spinal cord.

### 3.3. MRI data of patients with anti-MOG antibodies

Brain lesions were detected in 14/21 patients (Table 1). Cortical lesions were detected in 2 patients, while 8 patients had juxtacortical lesions, 11 had lesions in the deep white matter, and 5 had periventricular lesions. Furthermore, lesions were detected in the corpus callosum in 5 patients, in the thalamus in 1 patient, in the brainstem in 2 patients and in the cerebellum in 3 patients. Eight out of 14 patients had non-specific lesions, 7 had poorly demarcated lesions, 3 had tumefactive lesions, 1 had Dawson finger, 4 had brain lesions with gadolinium enhancement and 2 had meningeal enhancement (Table 1, Fig. 1). Six patients had lesions in the optic nerve, while 5 of them with gadolinium enhancement. Spinal cord lesions were detected in 10/21 patients. All 10 patients had lesions in the cervical region, 6 in the thoracic region and 3 in the lumbar region (2 in the conus), while 8 had LEM (7/8 LETM); however most of the patients had not performed MRI in the whole spine.



**Fig. 1.** Brain and spinal cord MRI from patients seropositive by all three anti-MOG CBAs. A: patient no.17; relapse with cortical hyperintensity on the flair image, 12 years after ON. B-D: patient no. 8; at onset developed cortical encephalitis, with cortical hyperintensity on the flair image (B) and meningeal gadolinium enhancement (C) with subsequent complete clinical and radiological recovery (D). E-F: patient no. 16; brain tumefactive lesions (E) with enhancement of the spinal cord (F) with coexistence of NMDAR antibodies. G: brain flair image of patient 20 with tumefactive lesions. H,I,J: patient no. 14; a Dawson finger in the brain (H), cervical spinal cord load (I) and myelitis on the conus of the spinal cord (J; arrow).



**Fig. 2.** Brain and spinal cord MRI from patients, positive for IgG1 anti-MOG, but below the level of positivity for total IgG anti-MOG with the live or fixed CBA. A,B: patient no. 12 with extensive cervical myelitis lesion (A) and a periependymal meencephalic brainstem lesion (B; arrow). C,D: patient no. 21, with extensive thoracic myelitis lesion (C), with central involvement (D) and with non-specific brain lesions (E). F: patient no. 13, with myelitis, extended to two cervical segments. G,H: patient no. 18, with tumefactive brain lesion (G) and cervical extensive myelitis (H). I,J.: patient no. 19; with brain periventricular lesions (I) and spinal cord extensive myelitis (J).

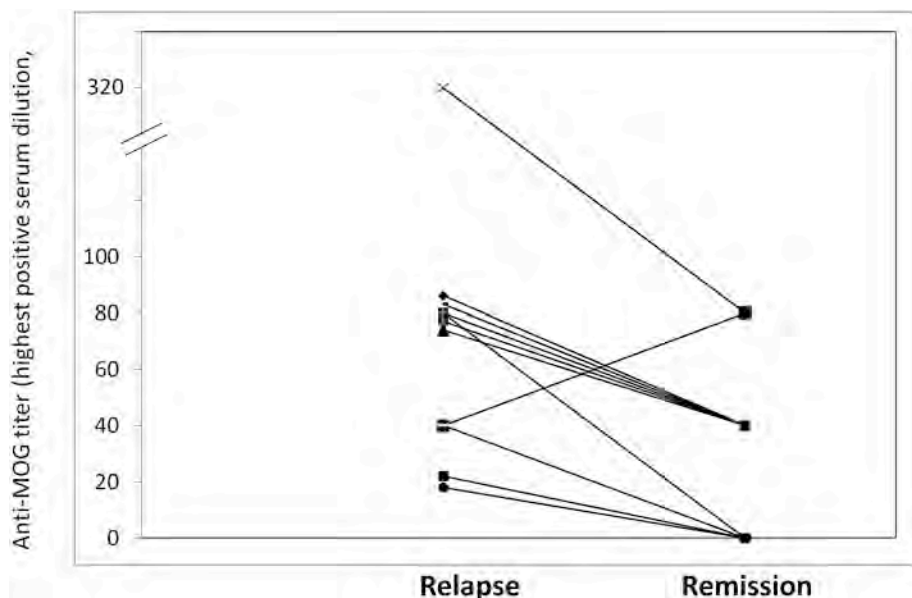
**3.4. Laboratory data of patients with anti-MOG antibodies**

Changes in anti-MOG titers in 11 patients were detected during relapse and remission phase of the disease. Fig. 3 shows a considerable correlation between anti-MOG titers and disease severity for 10/11 individual patients, while 4 patients converted to anti-MOG seronegative with disease in remission phase (patients no. 3,13,18 and 21). Three of these 4 patients converted to seronegative were under immunosuppressive treatment. Only in patient no. 15 (with the diagnosis of encephalitis) the titer of anti-MOG antibodies increased during remission, without treatment. Although there were high and low titers among the patients in each clinical state, the average titer in relapse

was  $1/84 \pm 1/82$  whereas that in remission was  $1/33 \pm 1/30$ . In addition, we tested for anti-MOG antibodies in the CSF of 8 seropositive patients; only one had such antibodies (patient no.15), with the diagnosis of cortical encephalitis in the absence of oligoclonal bands. Oligoclonal IgG bands in the CSF were detected in 5/16 patients, 4 of which had brain lesions. None of those with final diagnosis of ON had detectable oligoclonal bands.

**3.5. Relapses and response to treatment**

In total, 9/21 patients relapsed at least once during 93.6 months of average follow up, with  $0.73 \pm 0.82$  relapses per year. Among the



**Fig. 3.** Correlation of anti-MOG titers with clinical fluctuations (relapse and remission) of individual patients. Sera of 11 anti-MOG positive patients were collected at a subsequent stage, while in remission and their titer for IgG1 anti-MOG antibodies was tested. The figure shows the change of titer for each patient between the two clinical states.

patients which relapsed: at onset, 6 had ON (out of the total 10 patients with ON), 1/4 had myelitis, 1/2 had encephalitis, and 1/3 had atypical MS. During disease exacerbation, almost all (18/19) patients were treated with steroids and responded effectively. Sixteen patients (16/21) received maintenance therapy (9 with azathioprine, 2 mycophenolate mophetyl, 3 steroids, 1 rituximab and 2 received MS therapies), whereas 5 patients did not receive any maintenance immunotherapy. Overall, the average relapse rate in the untreated group (including patients untreated for > 6 months) was  $1.1 \pm 1.8/\text{year}$  (for 13/21 patients), whereas in the treated group with immunosuppressive therapy for  $\geq 6$  months was  $0.52 \pm 0.7/\text{year}$  (for 13/21 patients). Patient no.20, who had received MS-specific therapies (INF-beta, followed by glatiramer acetate) had > 10 relapses during treatment in 10 years time and patient no.16 had a relapse immediate after receiving IFN-b. Overall, excluding deficits from optic nerve, residual deficit was present in 6/21 patients with mean EDSS score 2.8. Optic nerve residual deficit was present in 5 patients with mean value of 7/10 optic acuity.

### 3.6. Comparison of the anti-MOG IgG1 assay with the other two most popular anti-MOG CBAs

Subsequently we compared the efficiency of the IgG1-CBA with those of the other two popular anti-MOG CBAs.

Initially we compared the two in house live-cell CBAs in our hands, adopting the recommended serum dilutions (1/20 for the IgG1-CBA and 1/160 for the total IgG anti-MOG CBA). Firstly, we tested the specificity of the IgG anti-MOG CBA using as second antibody the anti-human IgG (H + L) antibody [IgG(H + L)-CBA], according to earlier studies [19]. Ten out of 142 (7%) sera from healthy controls were found positive at 1/80 dilution, of which 4 remained positive at the cut-off 1/160 dilution. This observation and the possibility that the anti-human IgG(H + L) may also cross-react with other immunoglobulin subtypes, due to the common L-chain among all immunoglobulin classes, likely including the less specific IgM [34], prompted us to further analyze the 10 healthy controls, positive at 1/80 dilution cases, and another 70 sera (of the 142 controls) found negative by the IgG(H + L)-CBA, using the more specific anti-human IgG (Fc specific) as second antibody, which is recently preferable [4]. With this anti-antibody, only 1 healthy control serum was found positive at dilutions 1/80 and 1/160 from the 10 cases and none of the additional 70 cases. Therefore, we adopted the anti-human IgG (Fc specific) as the second antibody for the live-cell whole IgG anti-MOG CBA [IgG(Fc)-CBA]. Then, these 80 healthy control sera (i.e. the 10 plus 70 sera tested for IgG-Fc) were tested with the IgG1-CBA (at 1/20 test serum dilution), and none of them was positive. Furthermore, we screened 40 anti-AQP4 positive sera with the two CBAs, i.e. the IgG(Fc)-CBA and the IgG1-CBA, at 1/160 and 1/20 test serum dilution, respectively; all sera were found negative with both assays. We also tested 25 of the above negative control sera (10 from healthy individuals and 15 from anti-AQP4 positive patients) with the commercial CBA and all were found negative.

Finally, we screened all 426 sera of our clinics with the live-cell IgG(Fc)-CBA and 144 of them with the commercial CBA. All tested sera which were negative by the IgG1-CBA were also negative with both IgG-CBAs. In contrast, among the 21 patients positive by the IgG1-CBA, 6 were negative by the IgG(Fc)-CBA (with below the cut-off titers: between 1/40–1/80) and 3 were negative by the commercial CBA, 2 of which were among the 6 negative by the IgG(Fc)-CBA (Table 3). Interestingly, both “double negative” patients had typical AQP4-seronegative NMO, both with history of ON and extensive myelitis lesions (Fig. 2A,C,D); specifically, no.12 had also a periependymal mesencephalic brainstem lesion (Fig. 2B), whereas no. 21 had non-specific brain lesions (Fig. 2E). Among the 4 patients negative by the IgG(Fc)-CBA and positive by the commercial CBA, patient no. 2 had ON with non-specific brain lesions, patient no. 13 had transverse myelitis, extended to two cervical segments (Fig. 2F), without findings in the brain MRI and absence of oligoclonal bands, patient no.15 had encephalitis, with

headache, epileptic seizures and CSF pleocytosis (60 white blood cells/ $\text{mm}^3$ , 12 polymorphonuclear and 48 lymphocytes), unremarkable for any infectious agents and complete clinical and radiological recovery; furthermore, patient no.18 had encephalomyelitis, with a few periventricular lesions, a tumefactive lesion in the brain MRI (Fig. 2G), LETM (Fig. 2H), and absence of oligoclonal bands. Finally, patient no.19, positive with the live-cell IgG assay (titer 1/320) but negative with the commercial assay, had ovoid-like periventricular and juxtacortical brain lesions (Fig. 2I), typical for MS, however with extensive myelitis in the cervical (Fig. 2J) and thoracic spine. Overall, all patients, including those which were seronegative with one or both of the additional CBAs, had characteristics of the anti-MOG demyelinating diseases.

## 4. Discussion

In this study, we screened for IgG1 anti-MOG antibodies a large cohort of patients suspected by their clinicians for “MOG-disease” (during 2016–2018), and we analyzed the clinical and radiological data of 21 seropositive patients (identified among 426 patients referred by our clinics) which belong to a broad spectrum of demyelinated disorders. In addition, comparison of the 3 popular CBAs [4,12,34,35] suggested the superiority of the IgG1-CBA. Early studies using a CBA for total IgG anti-MOG antibodies [19], showed the presence of high titers of anti-MOG antibodies, predominantly in patients with ADEM, and some patients with AQP4-seronegative NMO, ON, LETM or clinical isolated syndrome; yet such antibodies were also detected in several controls [19]. Apparently, this was due to the possibility that the anti-human IgG (H + L) antibodies used as second antibodies in those early CBAs, may cross-react with other immunoglobulin subtypes, likely including the less specific IgM [34]. More specific CBAs were needed.

Improvements in the MOG-CBA for anti-MOG antibodies have increased the specificity of the assay and therefore its usefulness for diagnosis. Currently, three are the most popular MOG-CBAs: detection of total IgG MOG antibodies by a live-cell CBA [4], a commercial fixed-cell CBA which also detects total IgG anti-MOG [12,35], whereas the third one is a live-cell CBA that selectively detects only the IgG1 subclass of MOG antibodies [34,35]. Nationwide studies, using the improved assays [5,12,13], detected MOG antibodies predominantly in patients with ON, followed by myelitis and ADEM-like presentation [13]. Based on such findings, specific criteria [18], recommendations for testing [11] and specific clinical and radiological features [8,22] were proposed.

The 21 anti-MOG seropositive patients of our clinics were found to belong to a broad spectrum of disorders. Nearly half of them (11/21), were diagnosed with ON or myelitis, with only 3/21 patients fulfilling AQP4-seronegative NMO spectrum disorder (NMOsd) criteria [36]. This observation is in agreement with previous reports, thus suggesting that anti-AQP4 seronegative NMOsd is not the most common clinical phenotype of MOG-disease [5,13]. Three patients suffered at some point from encephalitis, seronegative for other glia or neuronal antigens or infectious agents, followed by complete clinical and radiological recovery. These data agree with recent reports, showing the presence of anti-MOG antibodies in patients with encephalitis of unknown etiology, often with specific findings, characterized as cortical encephalitis [22,33]. Two patients were defined as having encephalomyelitis, based on the presence of tumefactive lesions and extensive myelitis [27]. One of these also had anti-NMDA antibodies, with a history of psychosis, similarly with previous observations [31]. Another three patients had brain lesions that fulfilled 2017 revised MS criteria [30]; however with atypical findings, suggesting the presence of anti-MOG associated disorder. MS characteristics [26] were atypical and they also had findings often detected in MOG-antibody associated diseases [11]. In accordance with previous reports [24], relapses were not an uncommon feature to our patients,  $0.73 \pm 0.82$  per year, with lower relapse rate in the patients who had received immunotherapy, than in the untreated

**Table 3**  
Anti-MOG titers of the 21 patients, analyzed with all three CBAs<sup>a</sup>

Pat. no.	Final diagnosis	IgG1 anti-MOG (limit 1/20)	IgG anti-MOG (limit 1/160)	IgG anti-MOG (commercial fixed-cell CBA)
1	NMO	1/80	1/640	Positive
2	ON	1/40	<b>1/80 Negative</b>	Positive
3	ON	1/80	1/320	Positive
4	ON (CRION)	1/80	1/320	Positive
5	ON (CRION)	1/320	1/1280	Positive
6	ON	1/80	1/320	Positive
7	ON (CRION)	1/160	1/320	Positive
8	ON (history of cortical encephalitis)	1/80	1/160	Positive
9	ON	1/160	1/640	Positive
10	Myelitis	1/80	1/320	Positive
11	Myelitis	1/1280	≥ 1/1280	Positive
12	NMO	1/40	<b>1/80 Negative</b>	<b>Negative</b>
13	Myelitis	1/20	<b>1/80 Negative</b>	Positive
14	MS with myelitis	1/80	1/320	Positive
15	Encephalitis	1/40	<b>1/80 Negative</b>	Positive
16	Encephalomyelitis	1/80	1/320	Positive
17	Cortical encephalitis	1/80	1/160	Positive
18	Encephalomyelitis	1/20	<b>1/80 Negative</b>	Positive
19	MS with myelitis	1/80	1/320	<b>Negative</b>
20	MS tumefactive	1/160	1/320	Positive
21	NMO	1/20	<b>1/40 Negative</b>	<b>Negative</b>

ON, optic neuritis; CRION, chronic relapsing inflammatory optic neuropathy. Negative results are marked with bold.

<sup>a</sup> All sera were also tested for AQP4-Abs by CBA and all were found negative.

group.

Comparison of all three most popular MOG-CBAs is needed in order to define the gold-standard CBA for MOG antibodies. In a recent extensive study [29], sera found anti-MOG positive by a live-cell IgG-CBA were then tested by the live-cell IgG1-CBA and the fixed-cell IgG-CBA. About 94% were also positive by the IgG1-CBA but the fixed-cell assay was much less sensitive [29]; yet it was not investigated whether the latter two assays could detect additional positive sera, negative by the live-cell IgG-CBA. Herein, we tested all 426 sera with all three CBAs. All 405 seronegative cases by the IgG1-CBA were also negative by the other two CBAs. Interestingly, among the 21 IgG1-CBA seropositive patients, 6/21 had negative titer for IgG(Fc)-CBA (below its cut-off of 1/160). The 1/160 cut-off for the IgG(Fc)-CBA was adopted as suggested by the original publication [19], in addition to our own observations, that lower serum dilutions (1/40–1/80) occasionally give false-positive results. Of note, all our 6 “seronegative” patients with this assay (but positive for IgG1-CBA) had considerable antibody titers (1/40–1/80) even if below the set cut-off, and had characteristic findings of MOG-disease; this suggests that when using the IgG(Fc)-CBA, titers below the cut-off have an ambiguous meaning, i.e. some might correspond to actual MOG-disease and some to negative “false-positive” sera. The commercial fixed-cell CBA was positive for 18/21 sera and negative for 3 sera, the 2 of which were also negative by the IgG(Fc)-CBA. In fact, these two “double seronegative” patients (no.12 and 21; but positive by the IgG1-CBA) had typical NMO.

Overall, the IgG1-CBA seems much more sensitive, and likely more specific, than the other two CBAs. Indeed the IgG1-CBA identified 21/426 seropositive patients, whereas the other two assays identified only 15/426 and 18/426 seropositives (all within the group of the 21 seropositives by the IgG1-CBA). Moreover, with this assay, a very good correlation was observed between anti-MOG titer and disease state; for 10/11 tested cases, the titer decreased between relapse and remission (Fig. 3) suggesting the possibility of disease monitoring. In fact, 3/4 patients (no 13, 18 and 21), IgG1-CBA positive at relapse (though negative by the total IgG-CBA), became IgG1-CBA negative at remission, further confirming the specificity of the IgG1-CBA assay. In addition, the IgG1-CBA was at least as specific as the other two assays, since none of the tested 120 negative controls was found positive by the IgG1-CBA, whereas one control serum was positive by the IgG(Fc)-CBA. Therefore, we tentatively conclude that the IgG1-CBA is more appropriate to be

generally adopted for the detection of MOG antibodies [34,35]; and the present study). Further studies are needed to support our findings in larger cohorts of clinically defined patients in order to establish the gold-standard assay for detecting anti-MOG antibodies (likely the IgG1-CBA) and to further define the boundaries of the still increasing MOG-spectrum of disorders.

## Funding

This work has been co-financed by the European Union and Greek national funds under the call RESEARCH – CREATE – INNOVATE (project: T1EDK-05024, MIS 5032815) and by a grant from the European Commission (H2020 MSCAS RISE, Contract No. 645648). The funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report or in the decision to submit the article for publication.

## Declaration of Competing Interest

J.S.T. and S.T. have shares in the research and diagnostic laboratory Tzartos NeuroDiagnostics, Athens. G.K. reports grants from Teva Pharmaceuticals and Genesis Pharma; personal fees from Novartis, Genesis Pharma, Sanofi-Genzyme and Teva Pharmaceuticals; non-financial support from Merck, Sanofi-Genzyme and Genesis Pharma. M.E.E. has received travel grants and consulting fees from Biogen, Novartis, Teva, Genzyme and Merck. C.K. received research grants from Biogen, Novartis, Teva, and Merck-Serono. All other authors declare no relevant to this work conflicts of interest.

## References

- [1] E. Bettelli, D. Baeten, A. Jager, R.A. Sobel, V.K. Kuchroo, Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice, *J. Clin. Invest.* 116 (9) (2006) 2393–2402.
- [2] M. Breza, N. Smyrni, G. Koutsis, E. Anagnostou, J. Tzartos, G. Velonakis, C. Kokkinis, C. Kilindireas, A. Papavasiliou, C. Kotsalis, Ocular flutter as presenting manifestation of pediatric MOG antibody-associated demyelination: a case report, *Mult. Scler.* 1352458518771872 (2018).
- [3] M. Breza, G. Koutsis, J.S. Tzartos, G. Velonakis, M.E. Evangelopoulos, D. Tzanetakos, K. Karagiorgou, G. Angelopoulou, D. Kasselimis, C. Potagas, M. Anagnostouli, L. Stefanis, C. Kilindireas, MOG antibody-associated demyelinating disease mimicking typical multiple sclerosis: a case for expanding anti-MOG

- testing? *Mult Scler Relat Disord*. 33 (2019) 67–69, <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.05.021>.
- [4] A. Cobo-Calvo, A. Ruiz, H. D'Indy, A.L. Poulat, M. Carneiro, N. Philippe, F. Durand-Dubief, K. Deiva, S. Vukusic, V. Desportes, R. Marignier, MOG antibody-related disorders: common features and uncommon presentations, *J. Neurol.* 264 (9) (2017) 1945–1955.
- [5] A. Cobo-Calvo, A. Ruiz, E. Maillart, B. Audoin, H. Zephir, B. Bourre, J. Ciron, N. Collongues, D. Brassat, F. Cotton, C. Papeix, F. Durand-Dubief, D. Laplaud, R. Deschamps, M. Cohen, D. Biotti, X. Aygnac, C. Tilikete, E. Thouvenot, B. Brochet, C. Dulau, T. Moreau, A. Tourbah, P. Lebranchu, L. Michel, C. Lebrun-Frenay, A. Montcuquet, G. Mathey, M. Debouverie, J. Pelletier, P. Labauge, N. Derache, M. Coustans, F. Rollot, J. De Seze, S. Vukusic, R. Marignier, Ofsep, Group, N.S. Clinical spectrum and prognostic value of CNS MOG autoimmunity in adults: the MOGADOR study, *Neurology* 90 (21) (2018) e1858–e1869.
- [6] C.L. de Mol, Y. Wong, E.D. van Pelt, B. Wokke, T. Siepmann, R.F. Neuteboom, D. Hamann, R.Q. Hintzen, The clinical spectrum and incidence of anti-MOG-associated acquired demyelinating syndromes in children and adults, *Mult Scler*. (2019), <https://doi.org/10.1177/1352458519845112> 1352458519845112.
- [7] F. Di Pauli, R. Hoftberger, M. Reindl, R. Beer, P. Rhombert, K. Schanda, D. Sato, K. Fujihara, H. Lassmann, E. Schmutzhard, T. Berger, Fulminant demyelinating encephalomyelitis: insights from antibody studies and neuropathology, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2 (6) (2015) e175.
- [8] D. Dubey, S.J. Pittock, K.N. Krecke, P.P. Morris, E. Sechi, N.L. Zaleski, B.G. Weinschenker, E. Shosha, C.F. Lucchinetti, J.P. Fryer, A.S. Lopez-Chiriboga, J.C. Chen, J. Jitrapakulsan, A. McKeon, A. Gadoth, B.M. Keegan, J.M. Tillema, E. Naddaf, M.C. Patterson, K. Messacar, K.L. Tyler, E.P. Flanagan, Clinical, radiologic, and prognostic features of myelitis associated with myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody, *JAMA Neurol.* 76 (3) (2019) 301–309, <https://doi.org/10.1001/jamaneuro.2018.4053>.
- [9] S. Jarius, I. Kleiter, K. Ruprecht, N. Asgari, K. Pitarokoli, N. Borisow, M.W. Hummert, C. Trebst, F. Pache, A. Winkelmann, L.A. Beume, M. Ringelstein, O. Stich, O. Aktas, M. Korporal-Kuhnke, A. Schwarz, C. Lukas, J. Haas, K. Fechner, M. Buttman, J. Bellmann-Strobl, H. Zimmermann, A.U. Brandt, D. Franciotta, K. Schanda, F. Paul, M. Reindl, B. Wildemann, cooperation with the Neuromyelitis Optica Study, G, MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 3: Brainstem involvement - frequency, presentation and outcome, *J Neuroinflammation* 13 (1) (2016) 281.
- [10] S. Jarius, I. Metz, F.B. König, K. Ruprecht, M. Reindl, F. Paul, W. Bruck, B. Wildemann, Screening for MOG-IgG and 27 other anti-glial and anti-neuronal autoantibodies in 'pattern II multiple sclerosis' and brain biopsy findings in a MOG-IgG-positive case, *Mult. Scler.* 22 (12) (2016) 1541–1549.
- [11] S. Jarius, F. Paul, O. Aktas, N. Asgari, R.C. Dale, J. de Seze, D. Franciotta, K. Fujihara, A. Jacob, H.J. Kim, I. Kleiter, T. Kumpfel, M. Levy, J. Palace, K. Ruprecht, A. Saiz, C. Trebst, B.G. Weinschenker, B. Wildemann, MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing, *J. Neuroinflammation* 15 (1) (2018) 134.
- [12] S. Jarius, K. Ruprecht, I. Kleiter, N. Borisow, N. Asgari, K. Pitarokoli, F. Pache, O. Stich, L.A. Beume, M.W. Hummert, C. Trebst, M. Ringelstein, O. Aktas, A. Winkelmann, M. Buttman, A. Schwarz, H. Zimmermann, A.U. Brandt, D. Franciotta, M. Capobianco, J. Kuchling, J. Haas, M. Korporal-Kuhnke, S.T. Lillevang, K. Fechner, K. Schanda, F. Paul, B. Wildemann, M. Reindl, cooperation with the Neuromyelitis Optica Study, G, MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin, *J Neuroinflammation* 13 (1) (2016) 279.
- [13] M. Jurynczyk, S. Messina, M.R. Woodhall, N. Raza, R. Everett, A. Roca-Fernandez, G. Tackley, S. Hamid, A. Sheard, G. Reynolds, S. Chandratte, C. Hemingway, A. Jacob, A. Vincent, M.I. Leite, P. Waters, J. Palace, Clinical presentation and prognosis in MOG-antibody disease: a UK study, *Brain* 140 (12) (2017) 3128–3138.
- [14] S. Kinzel, K. Lehmann-Horn, S. Torke, D. Hausler, A. Winkler, C. Stadelmann, N. Payne, L. Feldmann, A. Saiz, M. Reindl, P.H. Lalive, C.C. Bernard, W. Bruck, M.S. Weber, Myelin-reactive antibodies initiate T cell-mediated CNS autoimmune disease by opsonization of endogenous antigen, *Acta Neuropathol.* 132 (1) (2016) 43–58.
- [15] F.B. König, B. Wildemann, S. Nessler, D. Zhou, B. Hemmer, I. Metz, H.P. Hartung, B.C. Kieseier, W. Bruck, Persistence of immunopathological and radiological traits in multiple sclerosis, *Arch. Neurol.* 65 (11) (2008) 1527–1532.
- [16] G. Krishnamoorthy, H. Lassmann, H. Wekerle, A. Holz, Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation, *J. Clin. Invest.* 116 (9) (2006) 2385–2392.
- [17] T. Litznerburger, R. Fessler, J. Bauer, H. Lassmann, C. Linington, H. Wekerle, A. Iglesias, B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice, *J. Exp. Med.* 188 (1) (1998) 169–180.
- [18] A.S. Lopez-Chiriboga, M. Majed, J. Fryer, D. Dubey, A. McKeon, E.P. Flanagan, J. Jitrapakulsan, N. Kothapalli, J.M. Tillema, J. Chen, B. Weinschenker, D. Wingerchuk, J. Sagen, A. Gadoth, V.A. Lennon, B.M. Keegan, C. Lucchinetti, S.J. Pittock, Association of MOG-IgG serostatus with relapse after acute disseminated encephalomyelitis and proposed diagnostic criteria for MOG-IgG-associated disorders, *JAMA Neurol* 75 (11) (2018) 1355–1363.
- [19] S. Mader, V. Gredler, K. Schanda, K. Rostasy, I. Dujmovic, K. Pfaller, A. Lutterotter, S. Jarius, F. Di Pauli, B. Kuenz, R. Ehling, H. Hegen, F. Deisenhammer, F. Aboul-Enein, M.K. Storch, P. Koson, J. Drulovic, W. Kristoferitsch, T. Berger, M. Reindl, Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders, *J. Neuroinflammation* 8 (2011) 184.
- [20] R. Marignier, Unusual presentations of MOG antibody-associated central nervous system demyelination: expanding the spectrum, *Mult. Scler.* 25 (1) (2018) 128–129, <https://doi.org/10.1177/1352458518804127> (1352458518804127).
- [21] S. Mariotto, S. Ferrari, S. Monaco, M.D. Benedetti, K. Schanda, D. Alberti, A. Farinazzo, R. Capra, C. Mancinelli, N. De Rossi, R. Bombardi, L. Zuliani, M. Zoccarato, R. Tanel, A. Bonora, M. Turatti, M. Calabrese, A. Polo, A. Pavone, L. Grazian, G. Sechi, E. Sechi, D. Urso, R. Delogu, F. Janes, L. Deotto, M. Cadaldini, M.R. Bianchi, G. Cantalupo, M. Reindl, A. Gajofatto, Clinical spectrum and IgG subclass analysis of anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated syndromes: a multicenter study, *J. Neurol.* 264 (12) (2017) 2420–2430.
- [22] R. Ogawa, I. Nakashima, T. Takahashi, K. Kaneko, T. Akaishi, Y. Takai, D.K. Sato, S. Nishiyama, T. Misu, H. Kuroda, M. Aoki, K. Fujihara, MOG antibody-positive, benign, unilateral, cerebral cortical encephalitis with epilepsy, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 4 (2) (2017) e322.
- [23] M. Pedreno, M. Sepulveda, T. Armangue, L. Sabater, E. Martinez-Hernandez, G. Arrambide, Y. Blanco, S. Llufrú, E.H. Martinez-Lapiscina, P. Mulero, N. Sola-Valls, R. Ruiz-García, M. Tintore, J. Dalmau, F. Graus, A. Saiz, Frequency and relevance of IgM, and IgA antibodies against MOG in MOG-IgG-associated disease, *Mult Scler Relat Disord* 28 (2019) 230–234.
- [24] S. Ramanathan, S. Mohammad, E. Tantsis, T.K. Nguyen, V. Herheb, V.S.C. Fung, O.B. White, S. Broadley, J. Lechner-Scott, S. Vucic, A.P.D. Henderson, M.H. Barnett, S.W. Reddel, F. Brilot, R.C. Dale, Australasian, New Zealand, M.O.G.S.G, Clinical course, therapeutic responses and outcomes in relapsing MOG antibody-associated demyelination, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 89 (2) (2018) 127–137.
- [25] M. Reindl, F. Di Pauli, K. Rostasy, T. Berger, The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases, *Nat. Rev. Neurol.* 9 (8) (2013) 455–461.
- [26] M. Spadaro, L.A. Gerdes, M. Krumbholz, B. Ertl-Wagner, F.S. Thaler, E. Schuh, I. Metz, A. Blaschek, A. Dick, W. Bruck, R. Hohlfeld, E. Meinl, T. Kumpfel, Autoantibodies to MOG in a distinct subgroup of adult multiple sclerosis, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3 (5) (2016) e257.
- [27] M. Spadaro, L.A. Gerdes, M.C. Mayer, B. Ertl-Wagner, S. Laurent, M. Krumbholz, C. Breithaupt, T. Hogen, A. Straube, A. Giese, R. Hohlfeld, H. Lassmann, E. Meinl, T. Kumpfel, Histopathology and clinical course of MOG-antibody-associated encephalomyelitis, *Ann Clin Transl Neurol* 2 (3) (2015) 295–301.
- [28] M. Spadaro, S. Winklmeier, E. Beltran, C. Macrini, R. Hoftberger, E. Schuh, F.S. Thaler, L.A. Gerdes, S. Laurent, R. Gerhardt, S. Brande, K. Dormair, C. Breithaupt, M. Krumbholz, M. Moser, G. Krishnamoorthy, F. Kamp, D. Jenne, R. Hohlfeld, T. Kumpfel, H. Lassmann, N. Kawakami, E. Meinl, Pathogenicity of human antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Ann. Neurol.* 84 (2) (2018) 315–328.
- [29] F. Tea, J.A. Lopez, S. Ramanathan, V. Merheb, F.X.Z. Lee, A. Zou, D. Pilli, E. Patrick, A. van der Walt, M. Monif, E.M. Tantsis, E.M. Yiu, S. Vucic, A.P.D. Henderson, A. Fok, C.L. Fraser, J. Lechner-Scott, S.W. Reddel, S. Broadley, M.H. Barnett, D.A. Brown, J.D. Lunemann, R.C. Dale, F. Brilot, Australasian and New Zealand MOG Study Group, Characterization of the human myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody response in demyelination, *Acta Neuropathol Commun.* 7 (1) (2019) 145, <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0786-3>.
- [30] A.J. Thompson, B.L. Banwell, F. Barkhof, W.M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M.S. Freedman, K. Fujihara, S.L. Galetta, H.P. Hartung, L. Kappos, F.D. Lublin, R.A. Marrie, A.E. Miller, D.H. Miller, H. Montalban, E.M. Mowry, P.S. Sorensen, M. Tintore, A.L. Traboulsee, M. Trojano, B.M.J. Uitendaele, S. Vukusic, E. Waubant, B.G. Weinschenker, S.C. Reingold, J.A. Cohen, Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria, *Lancet Neurol.* 17 (2) (2018) 162–173.
- [31] M.J. Titulaer, R. Hoftberger, T. Iizuka, F. Leypoldt, L. McCracken, T. Cellucci, L.A. Benson, H. Shu, T. Irioka, M. Hirano, G. Singh, A. Cobo Calvo, K. Kaida, P.S. Morales, P.W. Wirtz, T. Yamamoto, M. Reindl, M.R. Rosenfeld, F. Graus, A. Saiz, J. Dalmau, Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis, *Ann. Neurol.* 75 (3) (2014) 411–428.
- [32] J.J. Wang, Z. Jaunmuktane, C. Mummery, S. Brandner, S. Leary, S.A. Trip, Inflammatory demyelination without astrocyte loss in MOG antibody-positive NMOSD, *Neurology* 87 (2) (2016) 229–231.
- [33] L. Wang, J. ZhangBao, L. Zhou, Y. Zhang, H. Li, Y. Li, Y. Huang, M. Wang, C. Lu, J. Lu, C. Zhao, C. Quan, Encephalitis is an important clinical component of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody associated demyelination: a single-center cohort study in Shanghai, China, *Eur. J. Neurol.* 26 (1) (2019) 168–174.
- [34] P. Waters, M. Woodhall, K.C. O'Connor, M. Reindl, B. Lang, D.K. Sato, M. Jurynczyk, G. Tackley, J. Rocha, T. Takahashi, T. Misu, I. Nakashima, J. Palace, K. Fujihara, M.I. Leite, A. Vincent, MOG cell-based assay detects non-MS patients with inflammatory neurologic disease, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2 (3) (2015) e89.
- [35] P.J. Waters, L. Komorowski, M. Woodhall, S. Lederer, M. Majed, J. Fryer, J. Mills, E.P. Flanagan, S.R. Irani, A.C. Kunchok, A. McKeon, S.J. Pittock, A multicenter comparison of MOG-IgG cell-based assays, *Neurology* 92 (11) (2019) e1250–e1255.
- [36] D.M. Wingerchuk, B. Banwell, J.L. Bennett, P. Cabre, W. Carroll, T. Chitnis, J. de Seze, K. Fujihara, B. Greenberg, A. Jacob, S. Jarius, M. Lana-Peixoto, M. Levy, J.H. Simon, S. Tenembaum, A.L. Traboulsee, P. Waters, K.E. Wellik, B.G. Weinschenker, International Panel for N.M.O.D. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders, *Neurology* 85 (2) (2015) 177–189.